

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Maurice BOUSSARD

Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Pharmacie
Diplômé d'études supérieures de Microbiologie
Diplômé d'études supérieures de Chimie Biologique
Diplômé d'études spéciales de Sérologie
Ancien Interne et Lauréat des Hôpitaux
Attaché de Recherches au C.N.R.S.

Né le 13 mars 1933

Première thèse

Contribution à l'étude de quelques aspects du métabolisme azoté, carboné
et de la chromogénèse de *Pseudomonas cattleya* color

Deuxième thèse

Proposition donnée par la Faculté

“ Les Cytochromes bactériens ”

Soutenues le 6 Novembre 1959 devant la Commission d'examen

MM. REMY	<i>Président</i>
WERNER	<i>Examineur</i>
HILLY	<i>Examineur</i>
MARCHAL	<i>Adjoint au Jury</i>

THÈSES

présentées

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE NANCY

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Maurice BOUSSARD

Pharmacien

Lauréat de la Faculté de Pharmacie

Diplômé d'études supérieures de Microbiologie

Diplômé d'études supérieures de Chimie Biologique

Diplômé d'études spéciales de Sérologie

Ancien Interne et Lauréat des Hôpitaux

Attaché de Recherches au C.N.R.S.

Né le 13 mars 1933

Première thèse

Contribution à l'étude de quelques aspects du métabolisme azoté, carboné
et de la chromogénèse de *Pseudomonas cattleya* color

Deuxième thèse

Proposition donnée par la Faculté

“ Les Cytochromes bactériens ”

Soutenues le 6 Novembre 1959 devant la Commission d'examen

MM. REMY	<i>Président</i>
WERNER	<i>Examinateur</i>
HILLY	<i>Examinateur</i>
MARCHAL	<i>Adjoint au Jury</i>





Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITÉ DE NANCY - FACULTÉ DES SCIENCES

Doyen : M. URION.

Assesseur : M. ECHEVIN.

Doyens honoraires : MM. CORNUBERT, DELSARTE.

Professeurs honoraires : MM. DARMOIS, GUTTON, CROZE, RAYBAUD, FALLOT, LAFFITTE, LERAY, DONZELOT, JOLY, LAPORTE, EICHHORN, CAPELLE, GODEMENT, DUBREIL, SCHWARTZ, DIEUDONNÉ, DE MALLEMANN, LONGCHAMBON, OLMER, DODE, GAUTHIER.

Maîtres de conférences honoraires : MM. RAUX, LIENHART.

Professeurs :

Physique	MM. CHEVALLIER
Chimie biologique	URION
Analyse supérieure	DELSARTE
Zoologie	REMY
Géologie	ROUBAULT
Chimie industrielle	N...
Biologie animale	VEILLET
Botanique	ECHEVIN
Chimie organique industrielle	WAHL
Chimie théorique	BARRIOL
Physique	BIZETTE
Electronique	GUILLIEN
Chimie physique et électrochimique	GIBERT
Calcul différentiel et intégral	HERVÉ
Mécanique rationnelle	LEGRAS
Chimie biologique	DAVID
Minéralogie	BOLFA
Chimie	NICLAUSE
Physique appliquée	FAIVRE
Chimie minérale	AUBRY
Mécanique physique	COMOLET
Génie chimique	DUVAL
Radiogéologie	COPPENS
Géologie	HILLY
Chimie organique	DAVID
Physique expérimentale	SUHNER
Génie chimique	LE GOFF

Maîtres de conférences :

Botanique	MM. WERNER
Radiotechnique	FRÜHLING
Physiologie	GAYET
Phytopathologie	MANGENOT
M.M.P.	LIONS
Agronomie	GARNIER
Mathématiques générales	BRUHAT
Géochimie	SADRAN
Chimie biologique	CHAPON
Physique	HADNI
Physique	Mme ROIZEN
Géologie de la Lorraine	MM. N...
Chimie	MALAPRADE
Physico-chimie	REGNIER
Génie chimique	GOSSE
Minéralogie	KERN
Minéralogie appliquée	WEPPE
Physique de l'état métallique	LERMUSIAUX
Géologie	BERNARD
Mathématiques (propédeutique)	ARAGNOL
Mécanique appliquée	BONVALET
Physico-chimie industrielle	BASTICK
Physique théorique et nucléaire	RENARD

Secrétaire : M. LAPOINTE.

*A mes Parents,
Hommage de filial respect.*

*A ma femme et à mes enfants,
Témoignage de tendre affection.*

Meis et amicis !

A notre Président de Thèse,
M. le Professeur REMY,
(Professeur de Zoologie)

A nos juges,
M. le Professeur WERNER
M. le Professeur HILLY
M. le Professeur MARCHAL

Respectueux hommages.

AVANT-PROPOS

Les recherches expérimentales constituant la partie originale de cette étude ont été entreprises, durant ces trois dernières années, au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de NANCY.

Que Messieurs,

Le Professeur J.G. MARCHAL, Chef de ce Laboratoire, qui a bien voulu accepter la direction de cette Thèse,

Le Professeur REMY, qui a bien voulu en présider le Jury,

Et les Professeurs WERNER et HILLY qui ont eu l'obligeance d'en être aussi les Juges,

trouvent ici le témoignage de ma plus profonde reconnaissance.

C'est grâce à leurs conseils avisés qu'il m'a été possible de mener à bien ce travail. Je les en remercie très sincèrement.

Je n'aurais garde non plus d'oublier dans ma reconnaissante gratitude, ni mes Maîtres des Facultés de Pharmacie et des Sciences qui surent me prodiguer un Enseignement dévoué et profitable,

ni Monsieur le Docteur SENEZ, Maître de Recherches et mon « Parrain » auprès du Centre National de la Recherche Scientifique qui, par ses suggestions et le séjour qu'il me permit de faire en son Laboratoire, sut m'initier aux aspects nouveaux de l'enzymologie bactérienne,

ni enfin, mes collègues et camarades du Laboratoire de Microbiologie dont la serviable amitié aida à la réalisation de cette Thèse.

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE QUELQUES ASPECTS
DU MÉTABOLISME AZOTÉ, CARBONÉ
ET DE LA CHROMOGÉNÈSE
DE PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR

(J.-G. Marchal 1943)

INTRODUCTION

C'est en 1877 que débute la brillante série des travaux de PASTEUR, qui furent à l'origine de la Microbiologie et c'est en 1878 que SEDILLOT proposa le nom de « microbe » pour désigner, d'une manière générale, ces micro-organismes.

Orientée à ses débuts vers un aspect médical, la Microbiologie a vu peu à peu son domaine s'étendre, à tel point qu'il est admis maintenant de la diviser en trois grandes sections, qui sont :

1) La Microbiologie du sol : elle consiste en l'étude de tous les micro-organismes vivants sur ou au sein du sol et dont la présence conditionne le maintien de la vie sur le globe. Ils sont en effet impliqués, d'une manière constante et obligatoire, dans les cycles des éléments constitutifs de la matière vivante (azote, soufre).

2) La Microbiologie zoo- et phyto-pathologique : elle s'intéresse aux germes pathogènes, tant pour le Règne végétal que pour le Règne animal (Microbiologie vétérinaire et médicale) et aux moyens efficaces de lutte contre leur action.

3) La Microbiologie technique : elle s'intéresse aux modifications chimiques, provoquées par les bactéries vivant en tant que saprophytes et aux applications pouvant en résulter sur le plan pratique.

Cette troisième section a acquis une grande importance. Elle est à la base d'une foule de préparations : produits chimiques (alcool, acide lactique), biologiques (enzymes, antibiotiques), industrielles (rouissage de plantes textiles), alimentaires (vin, fromage). Pour l'obtention, la purification ou le dosage de certaines substances, le recours à une technique microbiologique est encore le procédé le plus économique (obtention d'un isomère de certains corps) ou parfois même le seul utilisable (dosage de certaines vitamines).

De cet aspect technique de la Microbiologie découlent aussi toutes les applications tendant à lutter contre les micro-organismes : conservation des denrées alimentaires (action de la chaleur ou du froid, dessiccation, salage, etc.), Microbiologie de l'eau (eau potable, eaux résiduaires), par exemple.

Sur le plan théorique, les nombreuses études dont la desmolyse des micro-organismes a été l'objet, constituent un des chapitres les plus intéressants de la Microbiologie. La recherche approfondie des modifications apportées par les bactéries dans le milieu où elles vivent a naturellement conduit à l'étude de leur métabolisme. On a pu alors comparer la biochimie bactérienne à celle des organismes supérieurs pluricellulaires, en fonction des connaissances acquises. Inversement, les phénomènes et théories reconnus exacts chez ces

derniers ont pu être recherchés et vérifiés dans le monde bactérien. De morphologique et descriptive qu'elle était tout d'abord, la Microbiologie est maintenant passée à un stade surtout biochimique. Pour la caractérisation d'une espèce par exemple, on fait maintenant appel autant à des caractères biochimiques spécifiques qu'à des critères morphologiques et culturels. Une classification des bactéries, en fonction de leur métabolisme, fut d'ailleurs établie par VAN NIEL et il est de fait que, pour certains genres ou espèces (anaérobies par exemple), seule l'identification biochimique permet une caractérisation sûre.

Comme tous les êtres vivants, les micro-organismes ont besoin d'énergie pour assurer leur croissance et leur multiplication. Quelques-uns d'entre eux peuvent emprunter cette énergie à la lumière, mais pour la plupart la seule source convenable est l'énergie chimique. Elle est fournie par la suite, maintenant classique, de toutes les réactions d'oxydation ou plutôt de déshydrogénation des substrats carbonés. L'enchaînement de ces réactions, faiblement exothermiques, permet la libération de quantités faibles mais intégralement utilisables d'énergie servant alors à l'édification de la matière vivante (mettant en jeu des réactions endothermiques) car suivant l'expression de SZENT-GYORGYI : « L'organisme vivant a besoin de petite monnaie. »

Or, pour la recherche et l'étude de ces réactions cataboliques, les bactéries constituent un matériel de choix, grâce à leur obtention facile et économique et à la rapidité de leur multiplication. Il est de plus relativement facile d'obtenir des mutants d'une souche donnée, dont le métabolisme est aberrant ou incomplet par rapport à celui de l'espèce normale. L'utilisation de tels mutants est souvent d'un grand secours pour préciser toutes les étapes intermédiaires de la biosynthèse ou de la dégradation d'un métabolite donné.

Les bactéries enfin sont parfois le siège de réactions biochimiques qu'elles sont les seules à pouvoir assurer, grâce à la présence d'enzymes qu'elles possèdent, mais que l'on ne retrouve ni dans le Règne animal ni dans le Règne végétal : c'est le cas de la cellulase et de la cellobiase, présentes chez des espèces appartenant aux genres *Cellulomonas*, *Clostridium* et *Cytophaga*, et qui assurent respectivement l'hydrolyse de la cellulose en cellobiose et celle du cellobiose en β -glucose. C'est à ces enzymes qu'est due la minéralisation de la cellulose dans le cycle du carbone (décomposition de la paille dans le fumier, des particules végétales dans l'estomac des ruminants).

Parmi les espèces bactériennes, certaines utilisent l'oxygène comme accepteur final de l'hydrogène : c'est le processus de respiration des bactéries aérobies. D'autres au contraire (bactéries anaérobies) ne peuvent utiliser l'oxygène élémentaire qui les tue, mais sont capables de réduire certains corps oxygénés : c'est la fermentation. La limite entre les deux processus est assez peu nette. Une même bactérie peut d'ailleurs, selon les conditions, utiliser l'un ou l'autre. Dans tous les cas, cependant, c'est la déshydrogénation des substrats qui procure l'énergie nécessaire à la vie.

Mais tous ces substrats ne sont pas d'égale valeur ; la capacité et le mode de dégradation des différents composants de la matière vivante est fonction de l'espèce considérée. Certaines bactéries peuvent vivre aux dépens d'une seule source d'énergie (acides aminés par exemple), d'autres, au contraire,

nécessitent la présence de plusieurs substrats bien déterminés dans le milieu de culture pour leur assurer vie et multiplication. En ce qui concerne les sources d'azote, par exemple, certains genres peuvent utiliser indifféremment des corps azotés minéraux (nitrates, ammoniac) ou organiques (amino-acides, urée) ; certains aussi ne peuvent se développer qu'en présence d'azote organique. Ajoutons à cela le rôle variable mais souvent nécessaire des facteurs de croissance et l'on aura une idée de l'ampleur et de la complexité des problèmes que peut poser l'étude de la biochimie des microbes.

La multiplicité des substrats azotés et carbonés utilisés par ces bactéries, la variabilité dans leurs facultés d'adaptation à tous ces corps organiques ou non (certaines espèces manifestant une spécificité très grande à l'égard de leurs sources de C et de N) ont conduit à sérier ces organismes dans une classification dont nous allons résumer les grandes lignes :

— D'un côté se trouvent les micro-organismes autotrophes qui utilisent des sources de carbone et d'azote minérales (CO_2 , nitrate, nitrite et ammoniac). L'énergie nécessaire à leur vie leur est fournie soit par la lumière (bactéries sulfureuses pourpres), soit par la chaleur dégagée lors de réactions d'oxydation de divers composés minéraux. Ces bactéries oxydent :

L'ammoniac en nitrite (Nitrosomonas),

Le nitrite en nitrate (Nitrobacter).

(Nitrosomonas et Nitrobacter vivent d'ailleurs en symbiose étroite.)

L'hydrogène en eau (Hydrogenomonas),

le soufre ou le H_2S en sulfate (Thiobactériales),

le Fe^{++} en Fe^{+++} (Chlamydo-bactériales),

CO ou CH_4 en CO_2 (Méthanomonas).

— D'un autre côté, on range tous les micro-organismes hétérotrophes exigeant un composé organique comme source de carbone et d'énergie. Ce groupe est à son tour divisé en trois en fonction des exigences concernant la source d'azote.

a) Les bactéries mésotrophes peuvent utiliser l'azote sous forme élémentaire ou combinée à l'état minéral.

b) Les germes métatrophes exigent la présence de un ou plusieurs acides aminés pour leur croissance. Ils ne peuvent employer NH_3 comme source d'azote. Ils étaient vraisemblablement mésotrophes mais ont perdu irréversiblement le pouvoir de synthétiser certains amino-acides (tryptophane) qui sont nécessaires à leurs synthèses vitales.

De plus, certains d'entre eux nécessitent aussi la présence d'autres corps organiques (vitamines, bases azotées) qu'ils trouvent généralement chez d'autres êtres vivants où ils prolifèrent alors : c'est le cas de nombre de germes pathogènes (Neisseria, Hemophilus, etc.).

A l'extrême enfin de cette classification, nous trouvons les virus et bactériophages qui se développent exclusivement en présence de matière vivante.

Les exigences parfois très strictes de certaines espèces tant du point de vue des conditions extérieures (température, oxygène, lumière) que de celui des sources d'énergie, de carbone et d'azote semblent devoir, a priori, infirmer leur présence réelle et active dans le monde vivant. Mais cette adaptation étroite répond à un but fonctionnel défini. Il ne faut pas oublier que c'est par l'action des micro-organismes qu'après leur mort, plantes et animaux retournent transitoirement au règne minéral ; ce processus de minéralisation remet à la disposition des végétaux, puis des animaux qui les « réorganisent », les éléments chimiques nécessaires aux synthèses de la vie. Grâce à ces cycles du carbone, de l'azote, du soufre, etc... la terre ne s'appauvrit pas en ces éléments et la vie reste possible, car, comme l'a dit PASTEUR, « sans eux (les microbes), la vie deviendrait impossible, parce que l'œuvre de la mort serait incomplète ».

Dans le cycle du carbone, leur rôle essentiel est de minéraliser les matières organiques d'origine vivante en CO_2 nécessaire ensuite à la synthèse chlorophyllienne. Les bactéries sont parfois seules capables de minéraliser certains corps carbonés (cellulose, pectine).

Dans le cycle de l'azote, le rôle des microorganismes est encore plus varié et certaines phases de celui-ci reposent uniquement sur leur action. C'est ainsi que la transformation de l'azote organique en ammoniacque, puis en nitrite et nitrate, parfois en azote élémentaire par les processus classiques d'ammonification, nitrosation et nitrification, est l'œuvre d'espèces microbiennes d'ailleurs associées en étroite symbiose. Il est à noter aussi que seules des bactéries (et aussi quelques Cyanophycées) sont capables d'utiliser l'azote gazeux élémentaire comme source d'azote.

Des micro-organismes interviennent enfin, d'une manière tout aussi importante dans les cycles du soufre (mise en liberté sous forme de H_2S du soufre organique sous l'action des bactéries de la putréfaction et oxydation, par le processus de sulfocification de cet H_2S en sulfate par les Thiobactériales), du phosphore (mise en liberté de phosphates aux dépens de matières organiques et phosphorées) et du fer (minéralisation des dérivés ferreux organiques, oxydation du fer par les Chlamydo-bactériales).

Les différents points de vue que nous venons d'esquisser sous lesquels on peut envisager la Microbiologie, donnent une idée de l'immensité du domaine de cette science qui est en particulier une base et un moyen d'investigation biochimique des plus féconds.

C'est pourquoi, dans le travail qui va suivre, nous nous sommes proposés de préciser certains aspects du métabolisme azoté et carboné d'une espèce bactérienne : *Pseudomonas cattleya* color (J.G. MARCHAL, 1943), et d'en étudier l'incidence sur une fonction spécifique des plus intéressantes de ce germe : sa chromogénèse.

MÉTHODES D'ÉTUDES

Pour tenter de définir avec précision le métabolisme des bactéries, il est nécessaire d'identifier et de caractériser non seulement les produits finaux de celui-ci mais encore, dans la mesure du possible, tous les intermédiaires. Tous ces corps utiles au maintien de la vie renferment en général des groupements fonctionnels variés : il peut donc sembler facile de les mettre en évidence grâce à des réactions spécifiques.

Il ne faut cependant pas oublier que le milieu où se trouvent ces métabolites est un milieu biologique complexe dans lequel ils peuvent s'y rencontrer en très faible quantité et en présence d'autres corps, inactifs ou sans intérêt, mais pouvant interférer dans la réaction de caractérisation. Dans certains cas, il peut être nécessaire d'avoir à identifier une série de substances appartenant à un même groupe chimique, et ne différant que par le squelette carboné sur lequel ne repose pas la spécificité du réactif : nous aurons donc une réaction caractéristique d'une fonction mais insuffisante cependant pour séparer les différents produits susceptibles de la donner (acides aminés). Dans le cas de ceux-ci, la ninhydrine (hydrate de tricéthohydrindène) réagit sur le groupement aminé en position alpha pour donner un produit de condensation coloré en violet. Tous les acides alpha-aminés donnent cette réaction : très bonne pour leur identification, elle est donc insuffisante pour leur séparation et la caractérisation de chacun d'eux.

Avant de pénétrer d'une façon précise un métabolisme déterminé nous pouvons déjà apprécier l'utilisation d'un métabolite par la mesure de l'intensité de la croissance de la bactérie en ou sans la présence de celui-ci. C'est ce que nous allons envisager tout d'abord.

1° MESURE DE LA CROISSANCE : MÉTHODE BIOPHOTOMÉTRIQUE

Il est classique de considérer que la croissance bactérienne s'échelonne en 4 phases (la somme des travaux et des théories se rapportant à ces phases de la croissance bactérienne a été bien résumée par MONOD [1942 - 143] :

1. — La phase de latence, où, sans encore se multiplier, les clones bactériens s'adaptent au milieu dans lequel ils se trouvent, et élaborent en même temps les facteurs nécessaires à leur croissance et à leur multiplication.

2. — La phase exponentielle de croissance : la culture croît à taux constant, la vitesse de développement étant alors proportionnelle à la densité de la culture.

3. — La phase d'état : le taux de croissance diminue alors et tend à s'annuler. La densité de la culture est alors maxima.

4. — La phase de décroissance qui conduit à la lyse et à la mort des bactéries (disparition des substrats, accumulation de produits toxiques, modification du pH, etc...). Cette lyse bactérienne peut d'ailleurs libérer des substances favorables à la croissance, d'où l'apparition quelquefois d'un phénomène de seconde croissance (croissance postlytique).

Cette libération par lyse de facteurs favorisant la croissance est probablement à l'origine du phénomène d'allélocatalyse, mis tout d'abord en évidence sur des animaux inférieurs (Ciliés) par ROBERTSON (1921) et étendu au domaine bactérien par certains auteurs [J.G. MARCHAL, MONOD, PHELPS et collaborateurs, entre autres - 129, 142, 163]. Ce phénomène explique les variations parfois considérables de la durée de la phase de latence chez une bactérie en fonction des conditions de culture.

Il est possible, par la méthode biophotométrique, d'étudier ainsi les différents stades de la croissance bactérienne en un milieu quelconque. Mieux encore, on peut ainsi apprécier directement l'influence favorable ou non de substances diverses sur le germe étudié.

Le principe de la méthode est simple : les cuves contenant le milieu sur lequel on veut faire croître les bactéries sont périodiquement frappées par un rayon lumineux reçu ensuite sur une cellule photoélectrique reliée à un milliampèremètre enregistreur : l'absorption de la lumière et l'intensité du courant qui en résulte sont proportionnelles à la densité de la culture (donc à sa croissance). On obtient ainsi la courbe de croissance en fonction du temps (appareil de BONNET, MAURY et JOUAN). Les cuves de culture sont placées dans une enceinte calorifugée à température réglable. Un système d'agitation magnétique permet une oxygénation constante du milieu. Les courbes obtenues à l'aide du biophotomètre permettent de retrouver les différentes phases que nous venons d'énumérer ; elles affectent une forme en « S » caractéristique.

2° MÉTHODES CHIMIQUES

Les méthodes chimiques sont d'une grande utilité pour étudier un métabolisme et nous avons eu recours à la technique générale proposée par PREVOT et son école (1948) pour identifier les produits élaborés par les micro-organismes. Elle consiste en la recherche de :

1. — Produits volatils neutres ou alcalins :

On les identifie dans un distillat obtenu à partir d'une culture microbienne sur milieu favorable. On ajuste à pH = 8 et on distille lentement jusqu'à obtention de 20 % du liquide initial. On caractérise alors :

a. — Alcools.

1 ml distillat + 1 ml solution de $K_2Cr_2O_7$ dans l'acide nitrique. Si après un séjour de 2 min au B.M. une coloration bleue apparaît, la réaction est positive.

On peut alors caractériser les différents alcools par des réactions spécifiques (éthanol, alcools supérieurs).

b. — Aldéhydes.

Ils sont caractérisés grâce à leurs propriétés réductrices : ils manifestent cette action, à froid sur le réactif de SCHIFF, le réactif de TOLLENS (nitrate d'argent ammoniacal) et la liqueur de FEHLING.

c. — Cétones.

Elles donnent, avec le réactif de NESSLER, un précipité blanc jaunâtre.

d. — Amines.

Elles précipitent avec les réactifs de MAYER (iodomercurate K) et de NESSLER.

2. — Acides de fermentation.

a. — Volatils.

On n'en peut avoir qu'une estimation totale (dosage acidimétrique du distillat obtenu par entraînement à la vapeur après acidification par l'acide tartrique du liquide ayant servi à la recherche des produits volatils). En effet, la classique méthode de DUCLAUX, utilisée pour différencier les acides volatils dans un milieu donne des résultats souvent erronés, comme l'a encore montré SOLEIL en 1958 [184].

Nous verrons ultérieurement que l'on arrive à une séparation et à une identification convenables de ces acides par la méthode chromatographique.

b. — Fixes.

Ils sont extraits du milieu par agitation avec de l'éther, après acidification de celui-ci par H_2SO_4 concentré ($pH = 2$).

L'éther est évaporé et dans le résidu repris par de l'eau distillée on peut caractériser les acides suivants :

Acide lactique :

(Réaction de DENIGES). 11 gouttes de la solution aqueuse (présumée contenir de l'acide lactique) sont placées dans un récipient avec V gouttes de H_2SO_4 concentré ; après passage au bain-marie bouillant pendant 5 minutes et refroidissement, on dépose à la surface du liquide, sans le mélanger, un peu d'une solution alcoolique de gaiacol à 10 %. Il se développe alors, s'il existe de l'acide lactique, une coloration rouge intense en anneau à la surface de séparation des deux liquides ; cette coloration diffuse dans tout le tube par agitation.

Acide pyruvique :

(Réaction de SIMON). On mélange dans un tube :

Solution à analyser	1 ml
Acide acétique 40 %	0,5
Nitroprussiate Na I %	3
Ammoniaque 50 %	1,5

Il se développe alors, en présence d'acide pyruvique, une coloration bleue.

Acide succinique :

On ajoute à quelques gouttes de la solution à analyser de l'ammoniaque jusqu'à réaction franchement alcaline. On évapore à sec au bain-marie, reprend par de l'eau distillée et ajoute un peu d'une solution de perchlorure de fer. L'acide succinique donne dans de telles conditions un précipité ocre de succinate double de fer et d'ammonium.

3. — Recherche directe de certains produits dans les cultures.

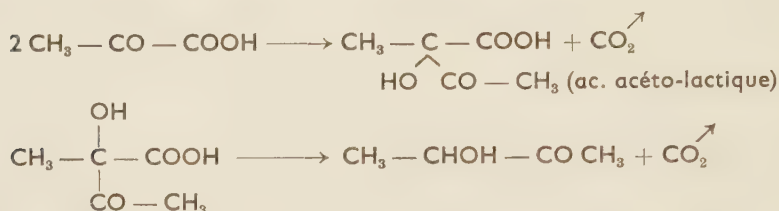
a. — Indole.

L'indole est produit par de nombreuses bactéries à partir du tryptophane. On le caractérise par la réaction de SALCOWSKI (formation d'un azoïque coloré) : au milieu de culture on ajoute du nitrite de Na + H_2SO_4 (ce qui donne NO_2H naissant), il se forme alors une coloration rouge (due au nitroso-indole) que l'on peut rassembler en ajoutant au milieu 1 ml d'alcool amylique : le colorant passe dans la phase alcoolique supérieure, non miscible.

Par la réaction d'EHRlich-KOWACS : l'indole donne une coloration rose à rouge sous l'action du réactif d'EHRlich (solution de p. diméthylamino benzaldéhyde à 5 % dans alcool chlorhydrique).

b. — Acétoïne (Acétylméthyl carbinol).

Ce corps est élaboré par certaines bactéries à partir de l'acide pyruvique [86 - 87 - 182]. Comme le montrent les schémas de réaction suivants :



Son identification repose sur le principe suivant : elle est, dans le milieu même, oxydée en diacétyle ($\text{CH}_3 - (\text{CO})_2 - \text{CH}_3$) que l'on distille puis transforme à l'aide du chlorhydrate d'hydroxylamine en l'oxime correspondante. Celle-ci, par adjonction d'ions Ni^{++} donne un précipité rouge caractéristique [92 - 207].

Nous avons employé la technique de LEMOIGNE, modifiée par KLUYVER et coll. [92]. On distille, sous réfrigérant ascendant, un mélange de 100 ml de culture filtrée et de 5 ml d'une solution à 25 % de perchlorure de fer : on recueille quelques ml du distillat dans un tube contenant 1 ml d'une solution à 20 % de chlorhydrate d'hydroxylamine. On ajoute alors 1 ml de solution d'acétate Na à 20 % et 0,5 ml de chlorure de nickel à 10 %. Après chauffage à ébullition, une réaction positive se traduit par l'apparition, à froid, d'un précipité rouge de diacétyl monoxime Ni.

c. — Nitrates.

Ils sont caractérisés par la coloration bleue qu'ils donnent par adjonction d'une solution sulfurique de diphénylamine (réactif de TILLMANS * - 200).

d. — Nitrites.

Ils sont très facilement identifiés et éventuellement dosés par la classique réaction de GRIESS.

e. — Ammoniaque.

On la caractérise à l'aide du réactif de NESSLER qui, suivant la concentration, donne une coloration ou un précipité jaune orangé. Cette méthode est d'ailleurs susceptible d'une application quantitative, par voie colorimétrique.

Pour doser NH_3 , nous avons utilisé 2 méthodes basées toutes deux sur le même principe : le déplacement par une base fixe de NH_3 , volatil, suivi d'un dosage acidimétrique.

* Dissoudre 0,085 g de diphénylamine dans 200 ml de H_2SO_4 à 25 % (vol./vol.) et compléter à 500 ml par H_2SO_4 pur.

Méthode de FOREMAN, modifiée par RAYNAUD et GROS [171] :

Elle permet le dosage de NH_3 présent sous forme de NH_4^+ , même en présence d'autres composés azotés (amines, amides, acides aminés) qui ne sont pas décomposés dans ces conditions et n'interfèrent donc pas.

A une partie aliquote de solution à doser on ajoute 4 à 5 fois son volume d'éthanol à 95° et quelques gouttes de thymol phtaléine ; on fait tomber alors goutte à goutte une solution de NaOH 0, 02 N jusqu'à coloration bleue de l'indicateur ($\text{pH} \sim 10$).

On opère alors le dosage de l'ammoniaque dans l'appareil et suivant le procédé de PARNAS-WAGNER, en se servant d'éthanol comme liquide de rinçage, l'entraînement par la vapeur devant durer au maximum 10 minutes. NH_3 entraîné est alors dosé par H_2SO_4 ou HCl titré en présence d'alizarine sensibilisée.

Méthode de CONWAY [41] :

Dans le procédé précédent, NH_3 était libéré à chaud de ses sels sous l'action d'un alcali ; ici il diffuse à la température ordinaire, au sein d'une enceinte close, contenant une cupule centrale où se trouve une solution acide fixant NH_3 au fur et à mesure de sa libération. On place dans l'espace annulaire de la cuve de CONWAY de 0,5 à 2 ml de solution à analyser + 1 ml de solution de K_2CO_3 saturée ; la cupule centrale contient une solution borique* destinée à fixer NH_3 libéré (1 ml). Après l'avoir fermée, la cellule de CONWAY est agitée mécaniquement pendant 2 à 3 heures. On la retire et procède alors au titrage de NH_3 fixé par la solution borique à l'aide d'acide titré (0,01 ou 0,02 N) en se servant de la burette de CONWAY ; l'adjonction d'acide est arrêtée quand l'indicateur (qui était passé au vert) reprend sa couleur rouge rosée initiale.

f. — Amino-acides.

Ils peuvent être facilement détectés, en bloc, par la coloration bleue qu'ils donnent à chaud avec la ninhydrine (hydrate de tricétohydrindène) en solution butanolique à 0,1 %. On ne peut malheureusement les caractériser séparément ainsi.

Certains d'entre eux pourraient être mis en évidence par des réactions spécifiques de leurs radicaux ; mais l'on se trouve en milieu biologique complexe et la présence de corps voisins peut provoquer des réactions faussement positives (l'histamine, par exemple, interfère dans le dosage colorimétrique de l'histidine).

Tout en étant très utiles, les méthodes chimiques d'investigation ne sont la plupart du temps pas suffisantes pour la recherche des intermédiaires et des produits finaux d'un métabolisme : la nécessité de grandes quantités de matériel biologique, le manque de sensibilité et de spécificité de certaines réactions, la présence de corps voisins gênants, sont autant de facteurs rendant l'identification recherchée difficile.

Aussi avons-nous dû faire appel à des méthodes physiques permettant :

— soit l'appréciation de l'utilisation de métabolites par la mesure de l'intensité de la croissance ou de la respiration de la bactérie en ou sans leur présence,

— soit une extraction ou une purification suffisante de substances intéressantes du métabolisme pour pouvoir les identifier alors (par voie physique et chimique) sans erreurs ni confusions possibles.

* Ac. borique crist. : 10 g, éthanol : 200 ml, eau : 700 ml, indicateur de virage : 10 ml, (vert bromocrésol : 0,066, rouge méthyle : 0,03), éthanol q.s.p. : 1000 ml, ajuster à teinte rose rouge (pH : 5, 5,1).

3^e MÉTHODE DE MESURE DE LA RESPIRATION

La consommation en oxygène de bactéries placées dans des conditions et au contact d'un substrat déterminés, est un témoin fidèle de la vie bactérienne en la présence de ce dernier et traduit en même temps l'intensité de son métabolisme.

Cette consommation peut être mesurée avec précision grâce à la technique manométrique de WARBURG. Celle-ci, basée sur le loi de MARIOTTE, consiste à ramener dans une enceinte de capacité constante et déterminée, les variations de volume gazeux (dus aux échanges respiratoires d'un matériel vivant) à une variation de pression à volume constant. La connaissance de ces variations permet alors de calculer la quantité de gaz formé ou disparu dans l'enceinte.

Après sa mise au point par WARBURG, le champ d'application de cette méthode a été défini par UMBREIT [198].

Le procédé classique de WARBURG consiste à mettre à température constante :

- le substrat placé dans le diverticule latéral de la fiole de WARBURG,
- la suspension bactérienne et un tampon convenable se trouvant dans l'espace annulaire,
- et une solution de KOH à 10 % étant déposée dans la cupule centrale.

La fiole est reliée à un manomètre à eau (contenant la solution de BRODIE ou de KREBS). Le CO_2 éventuellement dégagé est fixé par KOH.

Il est de même possible grâce à cette méthode de suivre l'absorption ou le dégagement d'autres gaz que l'oxygène (H_2 , N_2 , CO_2) en tenant compte de la solubilité de ces gaz dans l'eau.

On peut étudier également les produits qui peuvent prendre naissance au cours de l'expérience dans le milieu occupant l'espace annulaire de la fiole et qui proviennent de l'attaque du substrat et aussi le rôle d'activateurs, ou d'inhibiteurs, de l'utilisation de ce substrat.

Dans ces expériences, le matériel biologique d'étude est constitué :

- soit par des bactéries non proliférantes (« resting-cells » des auteurs anglo-saxons) obtenues à partir de cultures bactériennes jeunes,ensemencées sur un milieu adéquat et recueillies par centrifugation puis lavées et mises en suspension dans un tampon à une concentration convenable.
- soit par des extraits acellulaires contenant, sous forme d'une solution plus ou moins pure et riche, le ou les enzymes responsables de l'attaque et de la transformation de tel ou tel substrat.

4^e CHROMATOGRAPHIE

A. — Généralités.

Cette méthode est relativement récente. Les premiers essais datent de 1860, où SCHONBEIN remarqua que lorsque dans une solution contenant plusieurs colorants on plongeait des bandes de papier filtre, il y avait ascension capillaire de liquide et montée simultanée des colorants de la solution : ceux-ci s'arrêtaient à une hauteur variable, différente pour chacun d'eux. Ces travaux furent repris par son élève GOPPELSROEDER [1909 - 72] qui mit au point la technique de l'« analyse capillaire ». Vers la même époque (1906), TSWETT arrivait à séparer les pigments constitutifs de la chlorophylle brute par passage sur une colonne de phosphate de calcium.

Cette méthode est ensuite retombée dans l'oubli pendant une vingtaine d'années ; elle en est ressortie, en particulier grâce à DHERE, LASSEUR et coll. et LEDERER (1935-1938) et elle est maintenant devenue l'un des procédés

d'investigation les plus féconds utilisés en biochimie. Elle permet en effet une séparation efficace et constante de substances voisines, qu'il serait impossible d'identifier dans un mélange à l'aide des seules méthodes chimiques par exemple. Elle répond parfaitement aux 3 critères essentiels auxquels MACHE-BOEUF [120] avait astreint toute méthode de fractionnement efficace sur le plan biochimique, en effet :

- 1) elle est réalisable avec une quantité minimum de substances (ordre de quelques μg),
- 2) elle permet une caractérisation sûre, rapide et constante,
- 3) elle est d'un emploi général et facile, avec un matériel courant.

Sans entrer dans le détail de l'historique et des considérations théoriques et techniques de la méthode, que nous avons déjà eu l'occasion d'étudier [23], nous devons néanmoins souligner les points suivants :

La méthode chromatographique consiste en l'adsorption d'une ou plusieurs substances en solution sur un corps déterminé. Cet adsorbant ne doit pas réagir sur le corps qu'il fixe ni sur ses solvants. On fait alors passer sur la colonne un ou plusieurs solvants pour désorber spécifiquement le ou les corps fixés en s'adsorbant à leur place (élution) ; on recueille alors les filtrats correspondants.

Cette méthode est excellente et encore utilisée, mais elle nécessite toutefois une assez grande quantité du matériel à étudier.

Une importante modification, d'un immense intérêt en biochimie est la chromatographie de partage sur papier, de CONSDEN, GORDON et MARTIN [40] : la phase immobile est ici une feuille de papier spécial saturée d'eau, la phase mobile étant constituée par un ou plusieurs solvants miscibles ou non. Il y a partage constant des différentes substances entre l'eau et le (ou les) solvants non miscibles ; la grandeur du déplacement étant alors fonction de cette compétition entre l'action des deux phases.

En laissant cheminer un certain temps le liquide dans la feuille de papier, il est possible de caractériser chaque substance par son R_f qui est le rapport :

Distance du point d'arrêt de la substance au point de départ

Distance du point d'arrêt de la phase mobile au point de départ

Ce rapport est constant pour une substance donnée, en opérant avec une même phase mobile, un même papier et dans des conditions identiques. Signalement d'ailleurs en passant que le R_f n'est que partiellement fonction des différences de coefficients de partage, car on peut utiliser avec succès des phases mobiles contenant des solvants miscibles à l'eau [18 - 117].

Bien que de nombreuses techniques aient été utilisées avec succès [71 - 132], deux surtout sont employées. Elles consistent à faire soit monter soit descendre le long d'une feuille de papier le liquide de dispersion.

Dans tous les cas, le chromatogramme est préparé d'une manière classique qui consiste à déposer sur le papier des gouttes ou à faire des traits à la micropipette avec la substance solubilisée dans un liquide convenable, puis de chromatographier à température constante (20-22° C) pendant un temps plus ou moins long, fonction des solvants. Un séchage puis une révélation avec un réactif approprié terminent l'opération. Il est parfois nécessaire d'effectuer des chromatographies bidimensionnelles pour pouvoir séparer suffisamment les spots de certains corps, trop rapprochés les uns des autres dans la méthode monodimensionnelle.

Cette méthode nous a été précieuse, en particulier pour l'identification des acides aminés et des acides organiques. Dans les deux cas, elle fut réalisée après l'extraction sous forme de solutions relativement concentrées et pures des dits acides.

B. — Amino-acides.

Bien que certaines méthodes chimiques aient été mises au point pour la séparation des amino-acides (formation de sels Cu, de dérivés dinitrophényles) [42], il est évident que la chromatographie a été et reste le procédé de choix pour leur séparation, surtout lorsqu'ils sont en faible quantité. Mais auparavant il est nécessaire d'extraire ces acides des milieux de culture pour les séparer de nombreux produits influant sur l'allure des chromatogrammes obtenus (sels minéraux, lipides, polypeptides) et pour les concentrer : nous avons fait appel, dans nos recherches, aux trois méthodes d'extraction suivantes :

a. — Technique de BOULANGER et BISERTE [22] :

Après déprotéinisation de la solution à traiter par l'éthanol chlorhydrique 1 % (5 vol./1 vol. solution) et centrifugation, on évapore à basse température et sous pression réduite. On dissout le résidu dans une solution aqueuse de CH_3COOH à 1 % que l'on fait ensuite passer lentement sur une colonne (200/16 mm) de permutite 50. On doit recueillir 10 à 20 gouttes/min. La colonne est lavée à l'eau distillée (300 ml) puis on procède à l'élution des amino-acides fixés en utilisant une solution normale de NH_4OH . Après évaporation sous vide le résidu, repris par l'eau distillée, est chromatographié. La colonne peut être régénérée pour servir ultérieurement à l'aide d'une solution de HCl 2 N. Elle est enfin lavée à l'eau jusqu'à réaction neutre de l'effluent.

b. — Technique de LISSITSKY et coll. [115] :

On place la solution à traiter sur un morceau de papier à chromatographie que l'on sèche à l'air pour éliminer l'eau. Il est alors agité pendant 1 à 2 heures dans de l'acétone chlorhydrique à 1 % ; on centrifuge puis dans le liquide obtenu on évapore l'acétone sous vide à basse température. Les lipides sont éventuellement éliminés du résidu par CHCl_3 (3 ml pendant 15 minutes à 3 reprises). Le résidu, repris par l'eau distillée, peut alors être chromatographié.

c. — Technique de MACHEBOEUF [119] :

Après déprotéinisation par l'éthanol (5 vol./1 vol. de solution) et centrifugation, la solution est évaporée sous vide (50° C au maximum), et le résidu repris par l'éther (3 fois 5 ml pendant 5 minutes). Les solutions étherées sont rassemblées puis agitées avec 1 ml d' HCl à 1 %, ce qui permet de récupérer la partie d'acides aminés ayant pu se dissoudre dans l'éther. La liqueur aqueuse acide est alors ajoutée au résidu délipidé ; le tout est rééaporé puis traité par 4 fois 10 ml d'acétone chlorhydrique à 1 % (contact de 3 h.) : les liqueurs acétoniques sont rassemblées, évaporées sous vide et le résidu, redissous dans le minimum d'eau distillée, est prêt à être chromatographié.

En comparant les résultats obtenus en employant ces diverses méthodes nous avons préféré cette dernière, qui bien qu'assez longue, donne de bons résultats avec des pertes limitées d'acides aminés.

LA CHROMATOGRAPHIE PROPREMENT-DITE

a. — Préparation du chromatogramme.

La solution à chromatographier est appliquée en traits (ce qui diminue les « effets de queue » et permet une séparation meilleure des acides aminés de R_f voisins) le long de la ligne de départ, puis séchée ; le papier enroulé est alors monté, selon la technique générale dans le solvant choisi.

Les papiers utilisés furent : Schleicher et Schüll, 2403 A - Arches 302.

Les solvants que nous avons utilisés furent les mélanges suivants :

- 1) butanol, CH_3COOH , eau (40-10-50 vol./vol.) [62],
- 2) phénol, eau (3-1 additionnés de 0,3 % NH_4OH pure et 0,1 % KCN [62],
- 3) collidine saturée d'eau [62].

L'emploi conjugué de ces différents liquides permet une bonne caractérisation de tous les amino-acides (la cystéine et l'acide glutamique par exemple, qui possèdent le même Rf : 0,19 en butanol acétique, ont des Rf très différents en phénol ammoniacal, 0,07 et 0,30 respectivement).

Après séchage, le chromatogramme est révélé par vaporisation d'une solution de ninhydrine à 0,10 % dans le n-butanol puis passage de 5 minutes à l'étuve à 80-100° C. Les acides aminés donnent des spots bleu-violacés, la proline et l'asparagine ont une tache jaune.

Il est bien nécessaire de délimiter les taches au crayon après séchage du chromatogramme car les colorations tendent à disparaître. Pour fixer la place des spots dès la révélation et maintenir leur coloration, on peut aussi employer la technique de KAWERAN [89] qui consiste à pulvériser sur le spot une solution saturée de nitrate de cuivre dans un mélange d'alcool et d'acide nitrique : le cuivre forme un complexe rose avec l'acide aminé et la couleur du spot ainsi fixée est inaltérable (l'auteur signale cependant que toute lecture d'un chromatogramme doit se faire avant l'application de la solution cuivrique).

Pour préciser l'identification de certains spots nous avons parfois utilisé des réactions spécifiques d'identification de certains acides aminés, en particulier :

1. — Réaction de l'isatine [3] :

On pulvérise une solution d'isatine à 0,3 % dans le butanol. Dans ces conditions, la proline et l'hydroxyproline donnent un spot bleu, stable.

2. — Réaction d'EHRlich (solution au p. diméthylaminobenzaldéhyde) :

On obtient un spot violacé avec le tryptophane [189].

3. — Réaction de PAULY [44] :

Il y a formation d'un spot : — rouge avec l'histidine,
— violet avec la tyrosine.

Solution A : acide sulfanilique à 0,5 % dans HCl.

Solution B : nitrite Na à 5 %.

Solution C : Na_2CO_3 à 10 %.

On mélange extemporanément 10 ml de A + 5 ml B + 10 ml C que l'on pulvérise sur le chromatogramme.

4. — Réaction de SAKAGUCHI [2] :

Celle-ci est spécifique de l'arginine et des dérivés guanidylés qui donnent un spot allant du rose au rouge. Elle fait appel à un liquide dont la composition est la suivante :

Solution A : solution de α -naphthol à 0,01 % et d'urée à 5 % dans l'éthanol à 95°.

Solution B : 2 g de Br_2 dans 100 ml de NaOH N.

On ajoute au moment de l'emploi 5 pastilles de NaOH dans 10 ml de solution A. On pulvérise et fait sécher. Une deuxième pulvérisation est pratiquée avec la solution B.

5. — Réaction de FEIGL [57] :

Elle permet la révélation des amino-acides soufrés. Pour la réaliser on dissout dans une solution 0,05 N de I_2 1,5 % de NaN_3 , puis on trempe le chromatogramme. Les acides aminés soufrés donnent une tache blanche sur fond brun immédiatement pour la cystéine, après 15 minutes pour la cystine et après 60 minutes pour la méthionine.

Dans ces conditions, il semble donc facile de caractériser, grâce à l'emploi de différentes phases mobiles et accessoirement, de réactions spécifiques, tous les amino-acides de manière nette et sûre.

C. — Acides organiques.

Les résultats satisfaisants que nous avons obtenus avec la méthode chromatographique dans l'identification des acides aminés nous a naturellement amené à l'utiliser également pour déterminer les acides organiques intervenant dans le métabolisme de *Pseudomonas cattleya* color et qui peuvent être retrouvés à l'état libre dans les milieux de culture de ce germe.

Dans l'application de cette méthode nous avons rencontré tout d'abord de grandes difficultés car les spots étaient peu nets, présentaient des queues importantes, les R_f n'étaient pas constants, et leurs valeurs peu différentes pour plusieurs de ces acides, etc... Après une longue mise au point [23], fruit de nombreux essais et une étude critique comparative des nombreuses méthodes d'extraction et de chromatographies en utilisant des phases mobiles variées, nous sommes enfin arrivés à employer la méthode d'une manière assez satisfaisante.

Pour vérifier la constance des valeurs des R_f , nous disposions constamment sur les chromatogrammes des gouttes de solution d'acides témoins.

Nous avons aussi largement utilisé pour ces recherches la technique de chromatographie bidimensionnelle, car les spots des différents acides organiques sont souvent si rapprochés les uns des autres qu'il est difficile sinon impossible de les caractériser. La montée dans un deuxième solvant différent après rotation du chromatogramme de 90° permet ainsi une bonne différenciation des spots. Il est en effet ici généralement impossible d'utiliser des réactifs spécifiques de tels acides et ceux-ci sont mis en évidence seulement grâce aux propriétés de leur fonction-COOH.

Nous envisagerons successivement l'extraction et la séparation :

- 1) Des acides organiques fixe hydrosolubles,
- 2) des acides cétoniques,
- 3) des acides volatils,

qui nécessitent chacun des techniques différentes.

Nous avons toujours travaillé à température constante (21°) en utilisant le papier à chromatographie Arches 302.

I. — ACIDES ORGANIQUES FIXES HYDROSOLUBLES

a. — Extraction.

— **Par l'éther** : [73] Les cultures centrifugées sont amenées à pH = 1 par H_2SO_4 concentré. On ajoute alors 50 volumes d'éther pour 100 de culture et l'on place sur agitateur mécanique durant 10 à 12 heures ; on décante alors.

L'opération est recommencée 4 fois de suite, puis les solutions éthérées sont réunies et évaporées à basse température. Le résidu est dissous dans le minimum d'eau.

Cette méthode d'extraction est longue mais elle donne des spots bien nets, d'une résolution excellente, tous les anions minéraux présents dans le milieu étant éliminés. Les temps de contact entre l'éther et la solution sont nécessaires pour obtenir une extraction totale [135 - 158].

— **Usage de résines échangeuses d'ions** : Parmi les nombreuses méthodes proposées jusqu'à ce jour [27 - 83 - 164 - 186], nous nous sommes finalement arrêté à celle proposée par NORDMANN et Coll. [158 - 159] ; nous avons obtenu dans ces conditions d'excellents résultats en général superposables à ceux obtenus par extraction des acides à l'éther. Cette méthode a l'avantage (lorsque les résines sont préparées et purifiées) d'être plus rapide.

Mode opératoire :

On utilise une résine échangeuse fortement basique, le « Dowex II », de granulométrie déterminée (grains de 0,17 à 0,25 mm, soit 60-80 mesh USA) ; la résine est d'abord mise à gonfler dans l'eau pendant 2 heures, elle est ensuite répartie dans des colonnes de verre de 1 cm de diamètre sur une hauteur de 10 cm. La résine est alors purifiée, selon la technique de SAMUELSON [175] en faisant passer sur la colonne, à trois reprises, 10 ml de HCl N, 50 ml d'eau, 10 ml de NaOH 0,5 N et 50 ml d'eau.

La résine ainsi purifiée est transférée dans le cycle formiate par passage de formiate Na N et lavage par 500 ml d'eau. On fait alors passer sur la colonne 5 à 10 ml de la culture (débarassée des germes et du précipité par centrifugation) avec un écoulement de 1 ml par minute. L'effluent est rejeté et les acides fixés sont alors élués par l'acide formique 6 N (50 ml), qui entraîne, outre les anions organiques, une partie importante des phosphates et sulfates du milieu.

L'emploi de l'acide formique se justifie :

I. — Par le fait que sa constance de dissociation est supérieure à celle de tous les acides organiques rencontrés en biologie, l'acide oxalique excepté. Il éluera donc tous les acides en se fixant sur la résine à leur place.

2. — Par sa volatilité : on peut aisément l'éliminer en soumettant l'éluat à l'évaporation, ce qui en même temps permet sa concentration.

Tandis que les éluats sont concentrés par évaporation à basse température (50°) sous pression réduite, les colonnes de résine sont régénérées par passage sur chacune d'elles de 5 ml de formiate Na 3 M, 10 ml d'eau et 50 ml de H COOH 6 M, ce qui permet l'élution de tous les ions minéraux fixés par la résine.

b. — Chromatographie.

Nous avons employé les méthodes ascendante et descendante, puis la chromatographie bidimensionnelle qui seule nous a permis une séparation suffisante des spots de différents acides de Rf très voisins.

Nous avons rassemblé dans le tableau suivant les Rf obtenus en utilisant les phases mobiles suivantes :

- I. — n-butanol, acide formique, eau (40-10-50, séparer les 2 phases) [118].
- II. — Propanol, eucalyptol, acide formique (50-50-20, saturer par eau) [36].
- III. — Acétate d'éthyle, acide acétique, eau (30-10-10) [116].
- IV. — Acétate d'éthyle, eucalyptol, acide formique (30-10-10, saturé d'eau) mis au point par nous [23].
- V. — Ethanol, ammoniacque conc., eau (80-16-4) [117].

Les Rf d'acides (solutions témoins) dans ces phases, en technique ascendante, ont été les suivants :

**TABLEAU COMPARATIF DES Rf OBTENUS
EN TECHNIQUE ASCENDANTE EN EMPLOYANT
DES SOLUTIONS DES ACIDES SUIVANTS :**

Solvants	α -cétoglut.	citrique	fumar.	lact.	mal.	pyruv.	succinique	tartrique
I	0,72	0,44	0,86	$\frac{0,73}{0,83}$	0,50	0,74	0,76	0,30
II	0,57	0,25	0,84	0,56	0,20	0,63	0,81	0,11
III	0,90	0,66	0,93	$\frac{0,82}{0,88}$	0,71	0,80	0,90	0,53
IV	0,66	0,41	0,90	$\frac{0,70}{0,81}$	0,47	0,73	0,68	0,32
V	0,88	0,42	0,78	0,83	0,71	0,63	0,86	0,65

L'acide lactique donne 2 spots : l'un est dû à l'acide proprement dit, l'autre à l'acide lactyllactique, toujours présent dans les produits commerciaux.

Lors de l'utilisation de la technique bidimensionnelle, nous avons employé successivement deux de ces mélanges de solvants, en effectuant de préférence la première montée avec une phase alcaline, la seconde avec une phase acide. (V puis II, par exemple.)

c. — Révélation.

Après séchage du papier et élimination par évaporation durant 2 à 8 heures à la température ordinaire de l'acide (ou de la base) volatil compris dans les mélanges, une solution d'un indicateur de pH est pulvérisée sur le papier : les spots des acides se détachent alors nettement sur le fond différemment coloré du papier.

Après essai de plusieurs indicateurs, nous nous sommes finalement arrêté à l'usage de l'o. crésol sulfone phtaléine (pourpre de bromocrésol) en solution à 0,2 % dans un tampon véronal de pH = 8,6* [77]. Les acides ou leurs sels d'ammonium, apparaissent alors en jaune sur fond pourpre.

2. — CETO-ACIDES

Bien que leur séparation à l'état libre soit possible, ils ont cependant des valeurs de Rf voisines rendant leur identification malaisée. Il est donc préférable d'utiliser une méthode spécifique de caractérisation. Nous avons adopté l'élégant procédé de CAVALLINI et FRONTALLI [33] qui chromatographient ces acides sous forme de leur 2-4 dinitrophénylhydrazone.

La culture est déprotéinisée par l'acide tungstique colloïdal (tungstate Na + H₂SO₄ 0,66 N) puis filtrée ou centrifugée. On mélange alors, à 20 ml de filtrat 1 ml de solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine à 0,2 % dans HCl 2 N ;

* Véronal acide 0,184 g
Véronal sodique 1,03 g
Eau dist. q.s.p. 100 ml

après contact de 30 minutes, les hydrazones formées sont extraites à plusieurs reprises par l'éther éthylique (2 ml). Ce dernier dissout l'excès de réactif ainsi que les phénylhydrazones neutres. La couche ammoniacale est alors séparée, elle est prête pour la chromatographie ou l'électrophorèse.

Pour la réalisation de témoins, on a traité de même des solutions aqueuses à 0,5 % des acides α -cétooglutarique, oxaloacétique et pyruvique.

Les phénylhydrazones ainsi obtenues sont chromatographiées (technique ascendante) dans le mélange suivant [78] :

n-butanol	70 ml
éthanol	10 ml
NH ₄ OH 0,5 N	20 ml

Les révélations ultérieures des taches ne sont pas nécessaires, elles sont directement visibles grâce à leur coloration jaune. Elles sont très bien séparées, ainsi qu'en témoignent les valeurs de leur R_f :

acide pyruvique	0,49/0,64
acide α -céto glut.	0,13
acide oxaloacétique	0,18

Il faut noter que l'acide oxaloacétique donne souvent, en plus de son propre spot, les deux spots de l'acide pyruvique (qui eux sont dus, d'après CAVALLINI et FRONTALLI, aux deux phénylhydrazones isomères dues à l'existence d'une isomérisie cis trans). Ceci provient de la décomposition de l'acide oxaloacétique, substance instable en solution qui, par hydrolyse, donne de l'acide pyruvique.

Il est aussi possible de doser ces céto-acides par colorimétrie de leurs 2-4 dinitrophénylhydrazones, soit à partir du produit d'extraction, soit après élution à l'aide de NaOH des spots formés sur le papier chromatographique.

On mélange :

- 0,1 ml de solution extractive ammoniacale avec :
- 5,9 ml de solution à P.E. de NaOH 2 N et Na₂CO₃ à 10 %.

Après 15 minutes de repos, on lit au photomètre à 5.200 Å la densité optique de la coloration rouge-brun obtenue.

3. — ACIDES VOLATILS

Ils ne peuvent être caractérisés sous leur forme libre étant donné leur volatilité. Nous avons adopté la méthode d'identification de GUILLAUME et OSTEUX [77] qui donne de bons résultats et qui est la suivante :

On réalise l'entraînement à la vapeur des acides d'une prise d'essai contenant approximativement un milli-équivalent H⁺ ; on recueille dans un excès de NaOH ; après concentration, Na⁺ est éliminé par passage sur colonne de Permutite 50 ; l'effluent, contenant les acides volatils libres en solution à peu près pure est alors neutralisé par une solution de morpholine N (en présence d'o. crésol sulfone phtaléine). On concentre alors sous vide à basse température.

Quant à la permutite, elle est régénérée par passage de HCl N puis lavage à l'eau jusqu'à réaction neutre de celle-ci.

On chromatographie alors avec le mélange suivant préconisé par ces auteurs :

butanol.....	30 ml	} On opère suivant la technique descendante
cyclohexane	30	
propanediol 1-2	10	
NH ₄ OH.....	0,7	
morpholine	0,07	
eau	3,5	

Après séchage durant 1 heure à la température ordinaire, on pulvérise sur le chromatogramme une solution d'o. crésol sulfone phtaléine à 0,2 % en tampon véronal : les spots sont colorés en jaune sur fond pourpre.

Les valeurs des Rf obtenus sont les suivantes :

Formique	Acétique	Propionique	n. butyrique	n. valérique
0,27	0,36	0,47	0,63	0,78

5°. — CHROMATO-ÉLECTROPHORÈSE

L'électrophorèse nous a été surtout utile lorsque nous avions à contrôler certaines séparations qui ne nous avaient pas paru assez nettes sur les chromatogrammes.

Nous avons utilisé l'électrophorèse sur papier, selon les indications de DURRUM [47]. Nous nous sommes servi de l'appareil et de la méthode de MACHEBOEUF, REBEYROTTE et coll. [121], dite « électrorhéophorèse » ou électrophorèse en toit. Elle aussi ne nécessite que des prises d'essai minimales et donne des résultats constants.

Nous avons principalement utilisé cette technique :

1. — Pour l'étude et la séparation de certains acides aminés : on utilise alors le tampon véronal-véronal sodique préconisé par DURRUM ou celui de MICHAELIS au véronal, acétate Na et HCl [140]. Les acides aminés extraits selon la technique déjà indiquée (p. 24) sont soumis à l'électrophorèse à basse tension (250 V., soit 10 V/cm) pendant 4 heures; après séchage, ils sont révélés par la ninhydrine.

La lysine et le tryptophane qui ont des valeurs de Rf voisines (0,72 pour la première, 0,67 pour le second en butanol acétique) sont aisément séparés par électrophorèse en tampon véronal à pH = 8,6 : celle-là migre vers le pôle négatif, tandis que celui-ci a une mobilité électrophorétique à peu près nulle.

2. — Pour séparer les céto-acides : ceux-ci sont aisément séparables par électrophorèse sous forme de leur 2-4 dinithrophénylhydrazones [192]. On opère ici sous haute tension (360 v., soit 14,5 v/cm) pendant 4 heures en tampon de MICHAELIS de pH = 8,5 [140]. Les spots colorés en jaune migrent vers l'anode, suivant l'ordre (en mobilité croissante) : acide pyruvique (qui donne encore ici deux taches déjà signalées lors de l'étude chromatographique), acide α -cétoglutarique et acide oxaloacétique.

3. — Pour vérifier, en travaillant en tampon de pH différents, la pureté et pour déterminer le point isoélectrique du pigment de Ps. cattleyaeicolor.

6°. — POLAROGRAPHIE

Cette méthode, mise au point en 1921 par HEYROWSKY, est entrée dans le domaine de la pratique courante. Elle semble à l'heure actuelle pouvoir être utilisée très largement en Biologie et en Biochimie.

C'est une technique électrochimique : elle s'appuie sur l'interprétation des courbes courant-voltage obtenues lorsqu'un corps électro-oxydable ou réductible est électrolysé dans une cellule comportant une électrode externe au calomel et une électrode interne à goutte de mercure. On applique au système une différence de potentiel constamment variable et croissante. On mesure alors la variation de l'intensité du courant produit en fonction de la tension appliquée.

L'électrode au calomel, qui constitue l'anode, est pratiquement impolarisable ; la cathode au contraire consistant en un tube capillaire calibré d'où s'écoulent périodiquement des gouttes de mercure pur (15 à 20 par minute) est éminemment polarisable. Les courants prenant naissance entre ces deux électrodes sont alors amplifiés et enregistrés. Un potentiomètre actionné mécaniquement permet de faire varier la différence de potentiel entre les deux électrodes (nous avons utilisé l'appareil type PO_3 , Radiometer, Copenhague). Le schéma d'un polarographe est donné fig. 1.

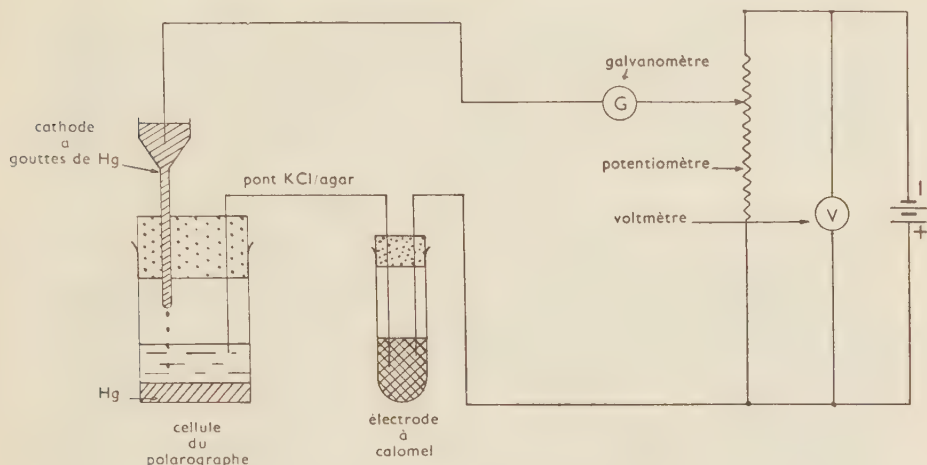


Fig. 1. — Schéma d'un polarographe

Nous ne pouvons évidemment entrer dans le détail de la méthode, largement traitée dans des ouvrages spécialisés [25-94-138]. Nous donnerons simplement une brève interprétation de la vague polarographique, dont un schéma est donné fig. 2.

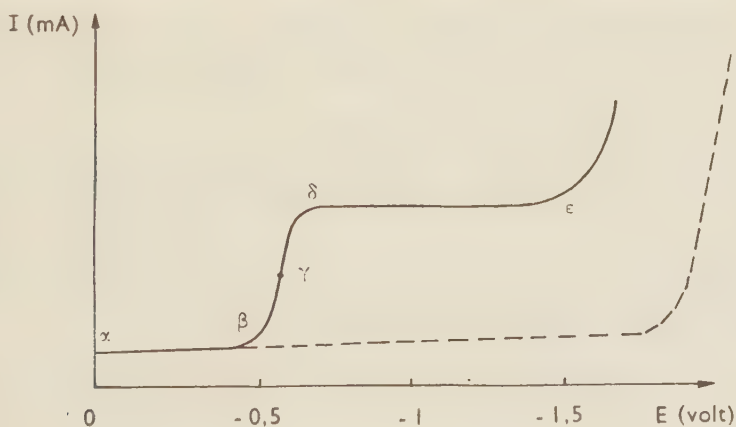


Fig. 2. — La vague polarographique

La substance oxydo-réductible à analyser par polarographie est placée dans un large excès d'un électrolyte de support non oxydo-réductible lui-même dans les conditions d'expérience ; cet électrolyte annule la force électrique due aux ions réductibles et ramène de ce fait le courant limite à un courant de diffusion. La force contre électromotrice de l'ensemble est modifiée lorsque la réduction (ou l'oxydation) du système varie en fonction du potentiel : cette modification se traduit par une augmentation brutale de l'intensité du courant donnant à l'enregistrement une courbe spécifique : la « vague ».

Cette vague se produit, pour une substance donnée et dans le même électrolyte de support, à un potentiel constant et sa longueur de plus est, entre certaines limites, proportionnelle à la concentration. Comme théoriquement toute substance oxydo-réductible, ionisable ou non, peut dans un électrolyte convenable, donner une vague, on voit d'ici l'étendue du champ d'application de cette méthode, d'autant plus qu'elle permet la caractérisation de quantités très faibles (de l'ordre du $\mu\text{g.}$) La courbe obtenue représente l'ensemble de plusieurs courants (fig. 2).

— $\alpha\text{-}\beta$ est le courant résiduel qui est dû à l'électrolyte ; on le détermine en enregistrant le courant produit en faisant varier le potentiel dans la cuve ne contenant que cet électrolyte (courbe témoin), le potentiel au point β est appelé potentiel de décomposition.

— $\beta\text{-}\delta$: courant de migration. A ce moment l'intensité du courant augmente brutalement jusqu'en δ où elle redevient constante. En β le potentiel est arrivé à un point où l'élément oxydo-réductible du système commence à se réduire au voisinage de la cathode (goutte de mercure) et cette réduction devient de plus en plus poussée au fur et à mesure que le potentiel croît : elle est fonction de la vitesse de diffusion des ions ou molécules répartis dans la solution vers la cathode et cette vitesse est constante et proportionnelle à la concentration en corps réductible ; au point γ , il y a équilibre entre la forme oxydée et la forme réduite (50 % de chaque) ; le potentiel de ce point est appelé potentiel de demi-vague ou de demi-palier : sa valeur est, dans un électrolyte donné, constante et spécifique d'un corps ou élément déterminé.

— $\delta\text{-}\varepsilon$: l'intensité est redevenue constante, on a ici affaire au courant limite constant ; il est fonction de la vitesse de diffusion.

En réalisant des polarogrammes avec des quantités croissantes de solution témoin du corps à tester, on constate aisément que la hauteur de la vague est proportionnelle à la concentration. On peut, de plus, analyser ainsi un mélange de plusieurs corps, chacun ayant un potentiel de demi-vague déterminé et constant.

Il faut d'autre part prendre soin de travailler en l'absence de O_2 qui risque de perturber l'allure des courbes ; on y arrive aisément en faisant barboter dans la cellule N_2 gazeux privé de O_2 qu'il contient par passage dans une solution alcaline de pyrogallol, ou mieux sur tube de quartz contenant de la tournure de cuivre chauffée au rouge.

Il est à remarquer enfin que les courbes obtenues pratiquement n'ont pas l'aspect linéaire du schéma présenté ici ; elles sont une suite de dents correspondant à la succession des gouttes de mercure. L'amplitude de ces oscillations dépend du courant de migration donc de la concentration en corps oxydo-réductible. Elle peut être amortie par un dispositif spécial lors de l'enregistrement. De même, l'on observe parfois au potentiel de décomposition, l'apparition de pointes de potentiels nuisibles pour une appréciation quantitative ultérieure ; il est possible de les faire disparaître par l'adjonction de certains colloïdes ajoutés en faible quantité (gélatine).

Cette méthode nous a permis de caractériser et de doser le fer contenu dans la molécule de pigment de Ps. *cattleyaecolor* ; nous avons pu suivre aussi ses propriétés complexantes à l'égard d'autres ions métalliques divalents. Nous nous sommes enfin rendu compte que la partie organique elle-même de ce pigment était susceptible d'oxydo-réduction et donnait, dans un électrolyte convenable, une vague polarographique.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Bien que la culture de beaucoup de bactéries soit de réalisation facile et que celles-ci puissent se contenter de substrats variés pour effectuer leur croissance et leur multiplication, il faut cependant remarquer que la cellule bactérienne est, comme tout organisme vivant, très sensible aux modifications du milieu dans lequel elle croît et aux troubles mêmes légers, qui peuvent apparaître dans ses fonctions organiques.

Comme pour tout être vivant l'énergie nécessaire à l'édification des constituants bactériens est le fait de réactions d'oxydation (ou de déshydrogénation) de composés organiques variés. La vie des bactéries nous apparaît donc comme étant le fait d'une longue suite de réactions chimiques conditionnant la synthèse de substances nécessaires (anabolisme) en même temps que leur dégradation (catabolisme). Là aussi, enzymes, coenzymes et vitamines agissent sur ces chaînes de réaction, modifiant les équilibres réactionnels dans le sens d'une activation ou d'un arrêt de celles-ci.

La biochimie moderne s'applique à la détermination des stades successifs du métabolisme des êtres vivants ; l'existence de voies métaboliques générales communes à l'ensemble du règne vivant, est maintenant bien établie et il a été fait souvent appel aux bactéries pour le prouver.

Les résultats déjà trouvés cependant dans le domaine bactérien [185 - 187] sont souvent encore l'objet de nombreuses controverses. Aussi ce travail a pour but d'étudier, à la lumière des connaissances actuelles, certains points du métabolisme azoté et carboné de *Ps. cattleyaecolor* (J.G. MARCHAL) dont nous allons tout d'abord donner les caractères.

CARACTÈRES DE *PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR*

Ps. cattleyaecolor a été isolé par J.G. MARCHAL [134] en 1942 dans une culture in vitro de tissu végétal ; il fut ensuite retrouvé, par le même auteur lors de l'analyse d'une eau alimentaire en 1944.

C'est un bacille de 1 à 4 μ de long, sur 0,6 de large ; il peut se présenter en culture sous forme d'éléments un peu plus allongés, à aspect de filaments. Ce germe est très mobile : il est lophotriche et possède à l'une de ses extrémités de 1 à 4 longs fouets, qui ont été mis en évidence grâce à la méthode de coloration de LEIFSON [107].

Il ne se colore pas par la méthode de GRAM et ne produit pas de spores. Il est aérobie anaérobie facultatif. Il croît entre 18° C et 38° C avec un optimum vers 25° C où il manifeste sa chromogénèse d'une façon correcte en milieu convenable. Sa croissance est nulle en anaérobiose stricte, sauf en présence de nitrates et d'une source convenable de carbone (glucose, glycérine).

C'est un auxo-autotrophe, qui pousse très bien sur les milieux usuels (eau peptonée, gélose, bouillon, etc...), et sur pomme de terre glycinée, où il donne un enduit brunâtre.

Il ne liquéfie pas la gélatine.

Cultivé sur eau peptonée ou en présence de tryptophane, il ne donne pas d'indole.

Il fermente, avec acidification, les sucres suivants : arabinose, ribose, xylose, fructose, galactose, glucose, mannose, glycérine.

Il réduit en aérobiose comme en anaérobiose les nitrates en azote gazeux et partiellement en ammoniacque.

Il produit de l'acétoïne (acétylméthyl carbinol).

Mais l'une des plus intéressantes particularités de ce germe est de produire, en milieu synthétique convenable, un pigment rouge violet caractéristique, hydrosoluble et diffusant dans le milieu. La présence de fer est nécessaire à l'apparition de ce pigment.

Ce pigment n'est pas produit quand *Ps. cattleyaecolor* est cultivé dans les milieux usuels ; il ne se manifeste pas non plus lorsqu'il est ensemencé dans un milieu synthétique L_1 privé de fer, bien que dans les deux cas il y ait croissance.

Les milieux utilisés pour la mise en évidence de ce pouvoir chromogénétique sont les milieux L_1 et L_2 de LASSEUR, dont la composition est la suivante

L_1	asparagine	0,90 g
	glycérine	2,50 g
	phosphate bipotassique	0,25 g
	sulfate de Mg	0,50 g
	chlorure de Ca	0,04 g
	sulfate ferreux	0,01 g
	eau	Q.S.p. 100 ml

Ajuster à pH = 6,9 et stériliser 20 minutes à 115° C.

L_2	asparagine	0,90 g
	glycérine	2 g
	glucose	1 g
	succinate de NH_4	0,10 g
	phosphate bipotassique	0,25 g
	sulfate de Mg	0,50 g
	chlorure de Ca	0,04 g
	sulfate ferreux	0,01 g
	eau	Q.S.p. 100 ml

pH et stérilisation identiques à celles du L_1 (mais opérer à 110° C).

En milieu L_1 , *Ps. cattleyaecolor* produit entre le 3^e et 5^e jour son pigment rouge qui prend d'abord naissance dans le fond du tube puis diffuse ensuite de bas en haut pour colorer toute la colonne liquide vers le 10^e jour.

D'autres substances azotées ou carbonées peuvent, comme nous le verrons, influencer cette chromogénèse.

PARTIE I

UTILISATION DE L'AZOTE MINÉRAL

PAR

PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR

Les éléments principaux concourant à l'édification de la substance vivante sont C, H, O et N. L'utilisation de sources variées d'azote et de carbone permettent de classer nombre de genres et d'espèces du monde bactérien en fonction de leurs capacités d'emploi. Nous nous sommes préoccupé d'étudier leur utilisation par *Ps. cattleyaecolor* à la lumière de nos connaissances actuelles.

L'azote se rencontre sous forme minérale ou organique. Les formes minérales de l'azote correspondent à une oxydation plus ou moins grande de cet élément ; elles sont les suivantes en adoptant leur ordre d'oxydation croissant :

NH_3 (et NH_4^+), NH_2OH , N_2 , différents oxydes de l'azote, NO_2^- et NO_3^- .

Au cours de ces recherches nous essaierons de dégager les étapes intermédiaires possibles de leur assimilation pour aboutir à la formation finale des protéides de *Ps. cattleyaecolor*.

A. — AZOTE MINÉRAL.

I. — MILIEUX ET SOURCES D'AZOTE UTILISÉS

Le milieu synthétique de base que nous avons utilisé (dénommé par la suite M.B.) contient les éléments minéraux nécessaires à toute croissance, il a la constitution suivante :

phosphate dipotassique	0,25 g
sulfate de Mg	0,50 g
chlorure de Ca	0,04 g
sulfate ferreux	0,01 g
eau	Q.S.p. 100 ml

Lors de sa stérilisation, on constate l'apparition d'un précipité formé de phosphates (Mg, Ca, Fe) qu'il n'est pas nécessaire d'éliminer sauf dans certains cas (lors d'expérience biophotométrique, par exemple, où le liquide nutritif doit être absolument limpide).

A ce milieu de base ont été ajoutées des sources de carbone (glycérine, lactate et pyruvate) sous forme de solution concentrée pour obtenir un taux final de 1 %. Ces solutions sont filtrées sur bougie L_3 (le pyruvate en particulier ne pouvant être stérilisé à la chaleur sans risque de décomposition).

Les sources d'azote employées furent :

— NO_3^- : sous forme de NaNO_3 à une concentration finale dans le milieu de 0,5 %.

— NO_2^- : sous forme de NaNO_2 à une concentration finale dans le milieu de 0,1 %.

— NH_2OH , HCl : concentration finale de 0,1 %.

— NH_4^+ : à l'état de chlorure ou sulfate, à la concentration finale dans le milieu de 0,5 %.

Nous avons aussi utilisé NH_4NO_3 , qui a la particularité d'offrir simultanément l'azote sous deux formes différentes.

Le milieu L_1 où est entretenue habituellement la souche de *Ps. cattleyaecolor* objet de notre étude, est pris comme témoin.

Tous ces milieux sont ajustés à $\text{pH} = 6,9$ et stérilisés par passage de 20 minutes à l'autoclave à 115°C .

II. — CROISSANCE DE *PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR* EN PRÉSENCE DE CES DIFFÉRENTS ÉLÉMENTS

I. — En aérobiose.

Ps. cattleyaecolor a été ensemencé sur ces différents milieux (7 ml par tube) à partir d'une suspension de germes cultivés sur gélose en fiole de ROUX. La culture âgée de 24 heures est rassemblée puis lavée 3 fois avec de l'eau distillée et finalement, après une dernière centrifugation, mise en suspension dans l'eau distillée. On ensemence alors chaque tube avec des gouttelettes identiques de celle-ci, de manière à ne produire dans les tubes aucun trouble visible à l'œil.

Les tubes sont placés à l'étuve à 25°C puis examinés tous les jours, la croissance en milieu L_1 servant de témoin (cf p. 34).

Au milieu synthétique de base ont été ajoutées des sources de carbone (glucose, glycérine, lactate) utilisables par *Ps. cattleyaecolor* ; l'influence des différentes sources d'azote sur la croissance de ce germe est résumée dans le tableau ci-après (tableau I).

L'étude biophotométrique de la croissance de *Ps. cattleyaecolor* en présence de ces corps azotés a confirmé les observations faites sur les cultures en tube. Nous avons opéré pareillement, en utilisant 8 ml de milieu (mais privé de son précipité) par cuve de biophotomètre.

La croissance nulle en présence de nitrite ou d'hydroxylamine, faible avec NaNO_3 ou les sels d'ammonium, est rapide et intense avec NH_4NO_3 , avec apparition à la fin de l'expérience de bulles de gaz qui viennent se dégager à la surface du milieu.

Ps. cattleyaecolor peut donc utiliser pour sa croissance l'azote sous forme minérale.

Si l'ammoniaque représente vraisemblablement le point de départ de la synthèse des composés azotés cellulaires, par formation d'amide avec un acide organique, puis d'acides-amino, *Ps. cattleyaecolor* peut cependant croître en présence de NO_3^- ; il réduit donc ceux-ci en azote (ceci est objectivé par le dégagement gazeux) et en ammoniaque par un mécanisme que nous tenterons de préciser ultérieurement.

TABLEAU I

INFLUENCE DE L'ALIMENT AZOTÉ SUR LA CROISSANCE DE PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR

SOURCES D'AZOTE					
Témoin milieu synthétique L ₁ (asparagine)	NaNO ₃ 0,5 %	NaNO ₂ 0,1 %	NH ₂ OH, HCl 0,1 %	NH ₄ Cl (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5 %	NH ₄ NO ₃ 0,5 %
Croissance nette dès le 3 ^e jour. La chromogé- nèse débute dans le bas du tube au 5 ^e jour.	Croissance fai- ble. Apparaît au 3 ^e jour. Dégagement ga- zeux à la surface du milieu au 6 ^e j. avec chromogé- nèse faible au 8 ^e jour.	Aucune croissance. Ces deux sources ne sont cependant pas toxiques pour le germe aux doses utilisées. Des réense- mencements effectués à partir de ces milieux sur milieu L ₁ ont prouvé la conservation de la vitalité de la bactérie.	Croissance dès le 3 ^e jour mais fai- ble et lente. La chromogé- nèse est aussi très discrète : elle débute au 8 ^e j.	Croissance rapide avec abondant dé- gagement gazeux au bout de 48 hrs. La chromogénèse se manifeste au 3 ^e jour ; aussi intense que dans le témoin elle apparaît d'em- blée dans toute la hauteur du tube.	

Ps. cattleyaecolor ne peut par contre métaboliser ni les nitrites, ni l'hydroxylamine.

Un cas particulier et intéressant enfin, est le comportement de ce micro-organisme en présence de NH₄NO₃. Ce sel contient N sous deux formes : nitrique (N au maximum d'oxydation) et ammoniacal (minimum d'oxydation). Nous venons de voir que chacune de ces deux formes permet la croissance de *Ps. cattleyaecolor*, mais celle-ci reste lente et l'énergie produite au cours de ces réactions permet aussi l'utilisation rapide et immédiate de l'ammoniaque dans ces diverses combinaisons organiques, car l'ion NH₄⁺ est ici présent dans le milieu. La présence simultanée de ces deux sources, utilisées chacune selon un processus différent, permet donc ainsi une croissance beaucoup plus rapide et importante.

Pour prouver d'ailleurs que celle-ci est bien due à l'emploi concomittant des deux formes d'azote, nous avons effectué des cultures de *Ps. cattleyaecolor* sur milieux où N était représenté à la fois par NaNO₃ et NH₄Cl (0,4 % et 0,2 %, respectivement) ; la croissance obtenue étant semblable à celle qui se manifestait dans les tubes contenant NH₄NO₃.

2. — Croissance en anaérobiose.

En général *Ps. cattleyaecolor* ne se développe pas en anaérobiose stricte. Nous avons cependant tenté de réaliser des expériences analogues à celles que nous venons d'envisager, mais en opérant en anaérobiose stricte. Les milieux étaient en tous points identiques mais l'ensemencement était réalisé en tubes de THUNBERG dans lesquels on opère sous vide ou sous une atmosphère de H₂, ou de N₂, privée d'oxygène. Le diverticule des tubes de THUNBERG contient par mesure de sécurité, une solution alcaline de pyrogallol servant à fixer l'oxygène de l'air pouvant éventuellement pénétrer dans le tube.

Avant de réaliser ces expériences, nous nous sommes assuré que *Ps. cattleyaecolor* ne possédait pas d'enzymes capables d'utiliser N₂ ou H₂.

A cet effet, dans des tubes de THUNBERG, convenablement lavés au mélange sulfo-chromique puis rincés à l'eau, nous avons réparti 7 ml de milieu

de base stérilisé contenant 1 % de glycérine que nous avonsensemencé avec une suspension de germes lavés. Après avoir fait un vide aussi poussé que possible on faisait rentrer N_2 pur (sans oxygène) ; cette opération était répétée 3 fois. Les tubes de THUNBERG étaient alors placés à l'étuve à 25° C. Dans ces conditions nous n'avons observé aucune croissance, même après un mois d'abandon à cette température. De plus, pour nous assurer qu'il n'existait dans ce système aucune forme combinée de N, nous avons essayé de déceler, dans le milieu de culture et dans le milieu nonensemencé, servant de témoin (qui avait été mis à l'étuve dans les mêmes conditions) :

- les nitrates (par la diphénylamine) ;
- les nitrites (par la réaction de GRIESS) ;
- l'ammoniaque (par le réactif de NESSLER) ;
- les acides aminés (par la ninhydrine à chaud).

Parmi ces réactions qui ont été négatives, seule la ninhydrine a parfois donné une très légère réaction positive qui peut s'expliquer par la lyse des bactéries introduites dans le milieu lors de l'ensemencement.

Ps. cattleyaecolor est donc incapable de fixer N_2 gazeux.

Nous avons de même constaté que *Ps. cattleyaecolor* ne possédait pas d'hydrogénase (enzyme capable de catalyser la réaction) :



que l'on rencontre chez certaines bactéries : telles que : *Clostridium kluyveri* [14], *Proteus vulgaris* [95], *Escherichia coli* [70], *Desulfovibrio desulfuricans* [174], etc...

On peut caractériser cet enzyme de plusieurs manières dont la plus simple, que nous avons adoptée, consiste en la réduction, sous l'action de l'hydrogène atomique formé, d'un colorant oxydo-réductible. Nous avons opéré de la manière suivante :

Dans des tubes de THUNBERG on introduit :

a. — Dans le tube :

- 1 ml de suspension bactérienne (à 1 mg N/ml)* en tampon phosphate 0,066 M de pH = 7.
- 0,5 ml de solution de colorant à 0,1 % dans l'eau.
- 1,5 ml de tampon phosphate 0,066 M.

b. — Dans le diverticule :

- 1 ml de solution de pyrogallol alcalin (P.E. de solution à 20 % de pyrogallol et de solution saturée de Na_2CO_3).

On place finalement le diverticule sur le tube.

Les indicateurs d'oxydo-réductions utilisés sont :

- Le bleu de méthylène, dont le dérivé réduit est incolore.
- Le benzylviologène, incolore sous forme oxydée, mais coloré en violet sous forme réduite.

* L'azote bactérien a été déterminé, une fois pour toutes, sur des suspensions bactériennes par minéralisation suivant la méthode de KJELDAHL suivie d'un dosage de l'ammoniaque formée. Nous mesurions en même temps la densité optique de ces suspensions. Nous savions donc, en ce qui concerne *Ps. catt.* qu'une suspension de ce germe, titrant 1 mg de N total par ml a une densité optique de 18° V (prise au photocolorimètre de BONNET-MAURY à 6.400 Å avec filtre rouge).

Le vide est alors effectué dans tous les tubes ; on les emplit ensuite d'hydrogène par dépression, sauf le témoin dans lequel on réalise une atmosphère d'azote (ces deux gaz doivent être privés de l'oxygène qu'ils pourraient contenir). On recommence cette opération 3 fois de suite.

Les tubes sont alors mis à l'étuve à 25° C et observés de 5 en 5 minutes. Nous n'avons, au bout de 2 heures, noté aucune décoloration (bleu de méthylène) ou recoloration (benzylviologène) supérieure à celle observée sous atmosphère d'azote (témoin endogène).

Ps. cattleyaecolor ne possède donc pas d'hydrogénase. Les expériences devant être faites en l'absence d'oxygène pourront en principe être réalisées indifféremment sous vide, en atmosphère de H₂ ou de N₂.

Or les cultures ainsi réalisées en l'absence d'oxygène (que ce soit sous vide ou en atmosphère inerte) n'ont montré aucune croissance sauf lorsque la source d'azote était constituée, en tout ou en partie, par le nitrate.

Pour essayer d'obtenir plus de précision, nous avons cultivé *Ps. cattleyaecolor* en tube de THUNBERG en anaérobiose dans les milieux contenant soit de la glycérine, du lactate, du succinate ou du malate comme sources de carbone, et où les nitrates de Na, K et NH₄ étaient les formes d'apport d'azote.

Nos observations sont rassemblées dans le tableau II.

TABLEAU II

**ASPECT DES CULTURES EN ANAÉROBIOSE
SUR MILIEU DE BASE CONTENANT**

Sources C	SOURCES D'AZOTE	
	NO ₃ ⁻ (K ⁺ ou Na ⁺)	NH ₄ NO ₃
Glycérine	Croissance après 48 heures avec dégagement gazeux.	Croissance dès la 32 ^e heure. Dégagement gazeux à la 40 ^e heure.
Lactate	Croissance après 48 heures. Dégagement gazeux au 3 ^e jour.	Croissance visible après 36 h. Gaz après 48 heures.
Succinate	Croissance débute lentement après 3 jours. Dégagement gazeux au 5 ^e jour.	Croissance début au 3 ^e jour. Gaz au 4 ^e jour.
Malate	Idem	Idem
Témoin L ₁	Aucune croissance après 10 jours de culture.	

On peut donc conclure que *Ps. cattleyaecolor* est capable d'utiliser NO₃⁻ comme source d'oxygène nécessaire à ses oxydations cellulaires, celui-ci fonctionnant comme accepteur final de l'hydrogène provenant des déshydrogénations successives du substrat hydrocarboné. Les autres sources d'azote, même oxygénées, telles que les nitrites, sont incapables de permettre la croissance dans ces conditions.

Il faut d'ailleurs remarquer que *Ps. cattleyaecolor* est loin d'être le seul microorganisme pouvant utiliser NO₃⁻ comme accepteur final de H₂ en anaérobiose : ce processus appelé « Nitrate respiration » par les auteurs japonais

(SATO, YAGAMATA [167 - 212]) ou « Nitrate dissimilatory reduction » par les auteurs hollandais (KLUYVER, VERHOEVEN, [92 - 201]) a aussi été mis en évidence chez de nombreux germes, tels que *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Micrococcus*, ect... Le nitrate se comporte suivant l'espèce considérée comme un accepteur nécessaire d'hydrogène (true nitrate dissimilatory reduction), ou comme un accepteur occasionnel dans certaines conditions de culture (incidental nitrate dissimilatory reduction) : cette seconde voie est le cas de *Ps. cattleyaecolor*.

III. — ÉTUDE DU MÉTABOLISME DE NO_3^- EN ANAÉROBIOSE

I. — Action des bactéries non proliférantes sur NO_3^- .

Les bactéries sont obtenues à partir d'une culture de 24 heures en fioles de ROUX effectuée sur gélose peptone nitratée à 0,5 %. On les met en suspension dans l'eau distillée puis on les lave 3 fois en mettant le culot obtenu par centrifugation en suspension dans l'eau distillée ; on disperse finalement les germes dans un tampon phosphate 0,066 M de pH = 6,9 de manière à obtenir un liquide titrant 10 mg N bactérien total/ml.

Les donateurs d'hydrogène utilisés sont : la glycérine, le lactate, le malate et le succinate sous forme de solutions 0,1 M neutres (pH = 6,9) et stériles (filtration sur bougie).

Ces solutions sont obtenues par neutralisation des acides correspondants avec la quantité théorique de NaHCO_3 . La source de NO_3^- est une solution stérile de NaNO_3 0,1 M.

Les expériences sont réalisées en tubes de THUNBERG en adoptant le protocole de distribution donné dans le tableau suivant :

TABLEAU III

	Tampon phosphate 0,066 M	Suspension bacté- rienne	Bleu de méthylène 10^{-3}	Substrat carboné	Nitrate	Coloration des tubes
Témoin de la respiration endogène	4 ml	0,5 ml	0,5 ml	—	—	décoloration partielle
Témoin du substrat carboné	3,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	—	décoloration totale
Témoin nitrate	3,5 ml	0,5 ml	0,5 ml	—	0,5 ml	décoloration nulle
Tubes de réaction	3,5 ml	0,5 ml	—	0,5 ml	0,5 ml	—

On opère sous vide, à 25° C, la solution de NO_3^- étant placée dans le diverticule. On attend 15 minutes avant de mélanger (l'équilibre de température demande sensiblement ce temps pour être atteint à l'intérieur des tubes). L'expérience proprement-dite débute après ces 15 minutes.

Le bleu de méthylène permet d'objectiver la déshydrogénation des substrats utilisés en comparaison de la décoloration obtenue dans le témoin de la respiration endogène de la suspension microbienne.

Les expériences sont arrêtées après 30 à 60 minutes. On constate que :

— Tous les témoins substrats sont plus ou moins décolorés, ils le sont davantage que le témoin endogène ; l'intensité d'utilisation de ces substrats étant, par ordre croissant de décoloration : malate, succinate, lactate et glycérine.

— Dans les témoins nitrate au contraire, on ne note aucune décoloration, bien que l'endogène soit lui partiellement décoloré : ceci prouve une réoxydation constante du leucodérivé à partir du nitrate présent.

— Dans le tube de réaction enfin, il est possible après centrifugation, permettant d'éliminer les corps bactériens, de mettre en évidence l'ion NO_3^- par la réaction de GRIESS.

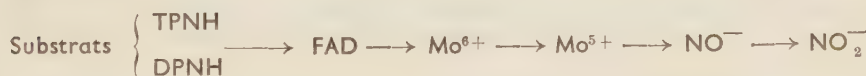
On peut de plus dans une partie de ces tubes de réactions, ajouter la solution de colorant : la coloration reste maxima et constante au cours du temps. Ceci traduit bien le rôle d'accepteur d'hydrogène que joue le nitrate, puisque le bleu de méthylène n'est absolument pas réduit, ou s'il l'est, il est immédiatement réoxydé par le nitrate.

2. — La nitrate-réductase de *Ps. cattleyae* color.

La réduction biologique des nitrates implique la présence chez *Ps. cattleyae* color d'une nitrate-réductase, enzyme qui détermine et catalyse cette réduction. Un tel enzyme a été isolé des végétaux supérieurs. C'est d'ailleurs grâce à ce pouvoir réducteur à l'égard de NO_3^- que ceux-ci sont autotrophes pour l'azote. Il a aussi été mis en évidence chez les champignons inférieurs tels que : *Neurospora crassa* (NICHOLAS, NASON et Mc ELROY, 1953) et chez des bactéries comme : *Escherichia coli* (NICHOLAS et NASON, 1954 [154]).

La nitrate-réductase permet la réduction du nitrate en nitrite, et l'on sait maintenant que la présence de molybdène est nécessaire à son action, ainsi qu'il ressort plus particulièrement des travaux de NICHOLAS et NASON [153] chez *Neurospora*, de EVANS et WALL [55] chez le Soja.

L'hydrogène nécessaire à la réduction est emprunté aux substrats grâce aux phosphopyridine nucléotides (DPN ou TPN)* ; ceux-ci sont alors réoxydés par une flavinonucléotide (FAD) ; le molybdène intervenant alors comme transporteur d'électron [152 - 154], comme cela est représenté par le schéma suivant :



L'ion phosphate est nécessaire à l'action de l'enzyme ; il n'y intervient pas cependant comme donneur d'énergie (liaison $\text{P}\sim$) car il ne se produit pas de phosphorylation ; en remplaçant cet ion par l'arséniate ou le sélénate, le cours de la réaction reste inchangé. Il est donc probable que PO_4 agit en saturant certaines valences ou coordinances de Mo.

* Dans la suite de ce travail, nous utiliserons les initiales suivantes, désignant :

DPN	: diphosphopyridinenucléotide	
DPNH	: —	réduit
TPN	: triphosphopyridinenucléotide	
TPNH	: —	réduit
FMN	: flavinemononucléotide	
FMNH ₂	: —	réduit
FAD	: flavineadéninedinucléotide	
FADH ₂	: —	réduit

Il est possible d'inhiber l'action de cette nitrate-réductase en ayant recours à des corps tels que KCN, ou mieux NaN_3 , qui complexent le molybdène nécessaire à son action.

L'activité nitrate-réductasique de cellules ou d'extraits obtenus à partir de celles-ci peut être facilement mesurée, soit par :

- Dosage colorimétrique (GRIESS) de NO_2^- formé
- ou bien en mesurant la vitesse d'oxydation du DPNH ou TPNH présent en même temps que la nitrate-réductase.

Les phosphopyridinenucléotides présentent en effet, sous leur forme réduite, un intense maximum d'absorption à 3.400 Å ; ce maximum disparaît quand ils sont sous forme oxydée. Il est donc possible de suivre spectrophotométriquement le passage de l'une à l'autre forme par mesure des densités optiques en fonction du temps.

a. — Obtention.

Nous avons recherché la nitrate-réductase de *Ps. cattleyae* en opérant avec des bactéries non proliférantes, issues d'une culture de 24 heures sur gélose peptone nitratée à 5 ‰ (à laquelle nous avons ajouté 2 mg ‰ de molybdate d'ammoniaque) effectuées en boîtes de ROUX. Les germes lavés étaient mis en suspension en tampon phosphate, (0,066 M, pH = 7) de manière à obtenir une concentration finale correspondante à 2 mg N bactérien/ml.

Dans des tubes de THUNBERG nous plaçons :

1. — Dans le tube :

- 0,2 ml de substrat 0,1 M (glycérine, lactate).
- 0,1 ml de NaNO_3 0,1 M
- 0,5 ml de tampon phosphate 0,066 M, pH = 7,

2. — Dans le diverticule :

- 0,2 ml de suspension bactérienne.

On ajoutait à ces systèmes une très faible quantité (environ 50 µg) de DPNH, réduit chimiquement par l'hydrosulfite de sodium suivant la technique indiquée par KAPLAN, COLLOWICK et NEUFELD [88].

Le nitrite formé était dosé colorimétriquement selon la méthode de GRIESS. Malheureusement, en présence des bactéries vivantes, il y a réduction du nitrite et l'on ne peut saisir convenablement la vitesse de réduction du nitrate.

C'est pourquoi il nous a fallu préparer à partir des bactéries un extrait acellulaire contenant la majeure partie de la nitrate-réductase et dans lequel sont éliminés les systèmes responsables de l'attaque ultérieure du nitrite : nous avons utilisé la méthode suivante proposée par NASON et EVANS pour extraire et purifier la nitrate-réductase de *Neurospora crassa* [148].

Les bactéries provenant d'une culture de 48 heures sur gélose peptone nitratée à 0,5 ‰ étaient lavées puis mises en suspension dans de l'eau distillée pure. Le tout était abandonné pendant 2 heures au réfrigérateur à -10° . On centrifugeait alors dans une centrifugeuse réfrigérée à -5° , -10° , et le culot obtenu était broyé au mortier avec de l'alumine dans 3 fois le poids de ce culot de K_2HPO_4 0,1 M glacé. Après une dernière centrifugation à grande vitesse durant 30 minutes à $+4^\circ$, l'activité nitrate-réductasique se trouvait concentrée dans le surnageant auquel on ajoutait du glutathion à la concentration finale de 10^{-3} .

L'activité de cet extrait a été mesurée en tubes de THUNBERG ou en fioles de WARBURG, en adoptant le protocole suivant :

Dans les tubes de THUNBERG ou l'espace annulaire de la fiole de WARBURG, on répartit :

a. — Dans le tube :

- 0,1 ml NaNO_3 0,1 M (soit 10 μ Mol.)
- 0,1 ml DPNH à 1 mg/ml (soit environ 1,5 μ Mol.)
- 0,6 ml tampon PO_4 de pH = 7,4
- 0,1 ml FMN à 1 mg/ml.

b. — Dans le diverticule :

- 0,7 ml d'extrait acellulaire* (titrant 2 mg N/ml).

Les solutions de DPNH et FMN ont été préparées extemporanément.

On opère à 25° C, sous air ou sous N_2 (les résultats trouvés ont été identiques à 6 % près). Après équilibrage des températures, on mélange (temps 0).

Il a été fait ainsi une série de 6 tubes + 1 témoin (où le DPNH a été remplacé par 0,1 ml de tampon phosphate).

La réaction est alors arrêtée après 5, 10, 15, 20, 25 et 30 minutes (tubes 1, 2, 3, 4, 5 et 6) par adjonction de 3 ml d'acide acétique à 10 % puis de 0,5 ml de réactif A de GRIESS (acide sulfanilique) ; après mélange on ajoute 0,5 ml de réactif B de GRIESS (naphtylamine) ; la coloration est mesurée après 10 minutes de contact au photomètre à 5.250 Å.

Il a été réalisé auparavant une courbe étalon donnant l'absorption de la coloration de solutions titrées de NO_2^- ; pour une concentration en nitrite comprise entre 0,1 et 4 μ Mol. par 5 ml de solution, on obtient une droite.

Voici les quantités de nitrite formé et la courbe de la réduction du nitrate en fonction du temps (tableau IV) (fig. 3).

TABLEAU IV

RÉDUCTION DU NITRATE PAR LA NITRATE-RÉDUCTASE DE PSEUDOMONAS CATTLEAECOLOR

N° des tubes	1	2	3	4	5	6
Temps (min)	5	10	15	20	25	30
Quantité de NO_2^- produit exprimée en μ Mol/5 ml	0,39	0,77	1,14	1,61	1,88	2,09

* L'azote a été dosé après minéralisation par la méthode de KJELDAHL,

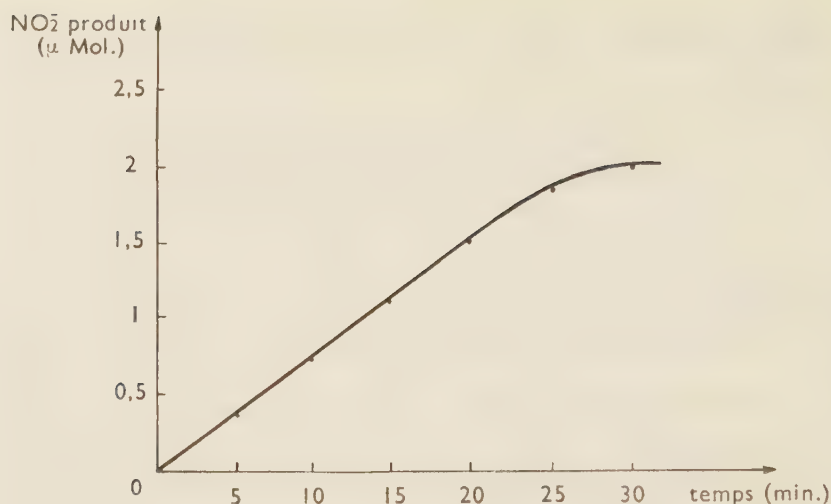


Fig. 3. — Courbe de réduction du nitrate par la nitrate-réductase de *Pseudomonas Cattlejaecolor* en fonction du temps

La vitesse de réduction du nitrate par l'extrait de *Ps. cattlejaecolor* est donc constante (du moins pendant les 20 premières minutes) : elle est de $39 \cdot 10^{-3} \mu \text{ Mol.}/\text{min}/\text{mg}$ d'azote à 25°C et à $\text{pH} = 7,4$.

L'accumulation de nitrite ne se produit pas *in vivo*, cet ion étant immédiatement métabolisé ; de toute façon, il deviendrait rapidement toxique pour la bactérie.

b. — Propriétés de la nitrate-réductase.

L'action de la nitrate-réductase est fonction :

1. — De facteurs physiques.

Cet enzyme est en effet inactivé par chauffage de 5 minutes à 80°C ; l'utilisation d'un extrait ainsi traité ne produit aucune réduction des nitrates après 30 minutes.

2. — De l'oxygène.

La présence de cet élément (du moins à la teneur existant dans l'atmosphère) influe peu sur son action (il y a dégagement gazeux en aérobiose comme en anaérobiose). Les oxydants cependant sont des inhibiteurs énergiques.

3. — Du pH.

Celui-ci a une grande influence ainsi qu'en témoignent les résultats d'activité ci-dessous (exprimés en $10^{-3} \mu \text{ Mol. NO}_2^-/\text{min}/\text{mg N}$) obtenus en travaillant en tampon phosphate dont le pH varie de 5 à 8 (tableau V). La durée des expériences était de 30 minutes.

TABLEAU V

INFLUENCE DU pH SUR L'ACTIVITÉ NITRATE-RÉDUCTASIQUE DE PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR

pH du milieu	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8
Activité exprimée en 10^{-3} μ Mol. NO_2^- /mn/mgN ..	7,3	17,1	26,8	32,6	38,6	38,7	39,2

c. — L'action de la nitrate-réductase est entravée par certains inhibiteurs.

Comme nous l'avons déjà signalé, quelques substances inhibent la nitrate-réductase ; particulièrement le cyanure de potassium et surtout le nitru de sodium. Nous avons donc suivi l'action de ces inhibiteurs, ajoutés à concentrations croissantes dans les mélanges réactionnels. L'inhibiteur se trouvait à des concentrations comprises entre 10^{-6} et 10^{-4} pour NaN_3 , 10^{-5} et 10^{-3} pour KCN.

Les réactions étaient arrêtées après 5 minutes ; l'activité nitrate-réductasique de l'extrait étant par définition égale à 100 %. Le nitrite était dosé colorimétriquement.

Les résultats obtenus ont été les suivants (tableau VI) :

TABLEAU VI

ACTION D'INHIBITEURS SUR LA RÉDUCTION DES NITRATES PAR PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR

Inhibiteurs utilisés	NaN_3 (M)					KCN (M)				
Conc. finale	10^{-6}	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-6}$	10^{-4}	10^{-5}	$5 \cdot 10^{-5}$	10^{-4}	$5 \cdot 10^{-4}$	10^{-3}
NO_2^- μ Mol/ $\frac{5}{2}$ ml	0,368	0,34	0,16	légère coloration	0	0,348	0,31	0,235	0,104	0,022
% d'inhibition	3	8	57	99	100	6	17	37	72	94
Témoin	0,372 μ Mol. NO_2^- après 5 minutes									

Ces deux inhibiteurs, d'après l'examen de ce tableau, ont donc, NaN_3 surtout, une action très nette même à faible concentration. Ce fait est encore confirmé, d'une manière assez empirique peut-être mais fort probante cependant, lorsqu'on étudie l'expérience qui suit.

Sachant que *Ps. cattleyaecolor* peut utiliser indifféremment pour sa croissance NO_3^- ou NH_4^+ et que seul NO_3^- peut permettre cette croissance en anaérobiose, il est possible de suivre le retentissement qu'auront sur celle-ci les perturbations du métabolisme du nitrate, dues en particulier à l'action d'inhibiteurs spécifiques de la nitrate-réductase (dont l'action constitue le premier chaînon de ce métabolisme).

Nous nous sommes arrêté dans notre choix à NaN_3 , car KCN est un inhibiteur trop polyvalent (et trop peu stable) pour donner des résultats interprétables avec quelque certitude.

Nous avons doncensemencé des tubes contenant le milieu minéral de base (MB) auquel nous avons ajouté NaN_3 (sous forme de solution stérile, et à des concentrations finales dans les milieux de 10^{-4} , 10^{-3} et 10^{-2} M) les sources de N étant constituées par :

NH_4Cl
 NaNO_3
 NH_4NO_3

Pour les milieux contenant NaNO_3 ou NH_4NO_3 , il a été réalisé en plus des ensemencements en anaérobiose.

L'observation des cultures au cours du temps montre que (tableau VII) :

— La croissance est pratiquement nulle par rapport à celle des témoins sans inhibiteur, dans les milieux contenant NaN_3 à 10^{-3} M, quelle que soit la source d'azote (il faut se rappeler que NaN_3 est capable aussi de complexer le fer des systèmes cytochromiques).

— Cette croissance est par contre peu touchée à la concentration de 10^{-5} M de cet inhibiteur.

— En présence de NaN_3 10^{-4} M par contre on note que :

a) Lorsque la source de N est NH_4Cl , la croissance est sensiblement égale à celle des témoins, après 8 jours.

b) Lorsque la source de N est NaNO_3 , il n'y a pratiquement aucune croissance et à fortiori aucun dégagement gazeux, ce que nous avons constaté même en anaérobiose.

TABLEAU VII

INTENSITÉ DE LA CROISSANCE ET DU DÉGAGEMENT DE GAZ SOUS L'INFLUENCE DE NaN_3

Source de N	Témoins sans inhibiteur	NaN_3 (concentration finale)			Jours de culture
		10^{-5}M	10^{-4}M	10^{-3}M	
NH_4Cl	+	+	0	0	2
	++	+	+	0	4
	++	++	++	0	8
NaNO_3	+	+	0	0	2
	+	+	0	0	4
	++ $\nearrow$ G	++ $\nearrow$ G	louche léger	0	8
NH_4NO_3	+	+	0	0	2
	+++ $\nearrow$ GG	++	+	8	4
	+++ $\nearrow$ G	++ $\nearrow$ G	++	0	8

+ = intensité de la croissance.

$\nearrow$
 G = dégagement de gaz.

c) Enfin, dans les tubes à base de NH_4NO_3 on note une croissance assez faible, sans dégagement gazeux, (contrairement aux témoins) en aérobiose ; le milieu reste clair par contre en anaérobiose (alors qu'il se trouble avec production de gaz chez les témoins). Ces constatations traduisent nettement a perturbation du métabolisme du nitrate par NaN_3 .

Toutes ces expériences objectivent bien la présence chez *Ps. cattleyae* color d'une nitrate-réductase active, le premier stade d'utilisation des nitrates étant grâce à elle leur réduction en nitrites.

IV. — MÉTABOLISME DU NITRITE FORMÉ

Le nitrite est une étape très importante du métabolisme de l'azote inorganique par les végétaux et les bactéries. C'est en effet le premier stade de la réduction des nitrates qui est produit dans tous les cas [92 - 201].

Mais si la voie de passage de NO_3^- à NO_2^- est unique, le métabolisme ultérieur du nitrite peut emprunter des voies différentes. Il peut y avoir :

a. — Réduction en oxydes de N ou N gazeux comme le montrent les équations chimiques suivantes :



La formation enzymatique de ces gaz a été mise en évidence par plusieurs auteurs en particulier par NAJJAR (1954) chez un germe dénitrifiant [*Pseudomonas stutzeri* - 145]. (Il est de fait d'ailleurs que de nombreux *Pseudomonas* produisent un dégagement gazeux, en présence de nitrate dans le milieu) et par VERHOEVEN chez diverses bactéries sporulées ou non [200].

b. — Transformation du nitrite en ammoniac soit par passage direct [166], soit avec formation intermédiaire d'hydroxylamine, ce qui est le cas général ; le donneur d'hydrogène étant d'origine très variée, il y a alors présence de deux enzymes distincts, une nitrite-réductase et une hydroxylamine-réductase. Quelquefois cependant, la réduction de l'hydroxylamine en ammoniac peut être le fait d'une simple réaction chimique, sans intervention enzymatique, un cytochrome servant d'intermédiaire [SENEZ et PICHINOTY, 1958 - 180, VERHOEVEN et TAKEDA, 1956 - 202].

La suite de réactions $\text{NO}_2^- \longrightarrow \text{NH}_2\text{OH} \longrightarrow \text{NH}_4^+$ a été mentionnée en particulier chez des bactéries non proliférantes, par AUBEL, opérant sur un *Clostridium* [10], WOODS sur *Escherichia coli* [210] en présence d'un donneur organique de H ou de H_2 lui-même (ces germes possédant une hydrogénase), et plus récemment par LEMOIGNE et coll. [110] sur *Bacillus megatherium* (en anaérobiose et en présence de glucose), KLAUSMEIER et BARD sur *B. subtilis* [91] et NASON et coll. sur *Neurospora crassa* [147 - 213].

Il faut remarquer qu'il n'existe pas une interdépendance très étroite entre les différentes étapes de la réduction de l'azote minéral : la souche de *Bacillus megatherium* utilisée par LEMOIGNE et coll. [110] qui réduit les nitrites en hydroxylamine puis ammoniac est incapable de réduire dans les conditions d'expérience du moins (en anaérobiose et en présence de glucose) le nitrate en nitrite, bien que ce germe puisse vivre en aérobiose avec NO_3^- comme seule source d'azote. Dans un même ordre d'idée, LASCELLES et STILL [99], étudiant une souche d'*Escherichia coli* arrêtant sa réduction du nitrate au stade nitrite, ont remarqué que celle-ci devait cet arrêt à l'absence d'un transporteur d'hydrogène convenable pour pousser plus loin la réduction : en effet, par adjonction d'un transporteur artificiel d'hydrogène (benzylviologène), elle devient capable d'effectuer cette réduction.

Il est très possible, et c'est même la règle, que NO_2^- soit dégradé par les bactéries pour donner simultanément azote et oxydes d'azote d'une part, hydroxylamine ou (et) ammoniacque d'autre part. L'étude de ces phénomènes et des facteurs qui la conditionnent est remarquablement décrite dans un ouvrage de VERHOEVEN [200].

A la lumière de tous ces faits, il nous a donc été possible de suivre les étapes de la dégradation du nitrate par *Ps. cattleyaecolor*. Nous avons opéré en fioles de WARBURG pour permettre une appréciation quantitative de la marche des réactions, sous atmosphère d'azote (privé de son oxygène, bien que la faible quantité — 2 à 3 % — qu'il contient ne gêne sensiblement pas la réduction). On ne risque d'autre part aucune interférence fâcheuse, *Ps. cattleyaecolor* étant, comme nous l'avons vu, incapable d'utiliser N_2 gazeux à la température de 25° C.

Le nitrite a été dosé colorimétriquement d'après la méthode de GRIESS.

Les dérivés azotés gazeux le furent par la méthode manométrique.

L'hydroxylamine a été recherchée par la réaction de BLOM [20]. Celle-ci consiste en l'oxydation par l'iode de NH_2OH en nitrite dosé alors colorimétriquement. Les nitrites éventuellement présents dans la solution sont éliminés par l'urée en milieu chlorhydrique. Nous avons utilisé la technique préconisée par LEMOIGNE, MONGUILLON et DESVAUX [109] :

On recherche d'abord les nitrites éventuellement présents dans 5 ml de solution par la réaction de GRIESS ; si celle-ci est positive, NO_2^- est détruit par adjonction de 5 % de HCl et 10 % d'urée, suivie d'un chauffage de une minute (ce chauffage a aussi l'avantage de détruire les combinaisons possibles de l'hydroxylamine avec certains composants de la solution : cétones, acides cétoniques). Après refroidissement, l'on amène le pH de la solution entre 2 et 3 à l'aide d'acétate de sodium solide, on ajoute alors 1 ml de solution d'acide sulfanilique* puis 1 ml de solution acétique d'iode à 1,3 %. L'excès d'iode est éliminé par adjonction d'une solution d'hyposulfite de Na à 2,5 % ; l'addition de 1 ml de solution d' α -naphtylamine** entraîne une coloration qui se développe totalement après 10 à 15 minutes de contact. La réaction est très sensible (10^{-9}).

L'ammoniaque est dosée par la méthode de NESSLER.

I. — Sort du nitrate.

Nous avons recherché les différents produits pouvant résulter de la dégradation du nitrate, à savoir : nitrite, azote, hydroxylamine et ammoniacque.

Dans chaque fiole de WARBURG on introduit :

a — dans l'espace annulaire :

- 0,5 ml de solution 0,2 M de substrat carboné soit 100 μ Mol.
- 2,4 ml de suspension bactérienne en tampon phosphate pH = 7,4 titrant 20 mg N/ml.

b — dans la cupule centrale :

- 0,2 ml de KOH à 10 %.

c — dans le diverticule latéral :

- 0,1 ml de solution 0,1 M de NaNO_3 , soit 10 μ Mol.

* Ac. sulfanilique..... 10,5 g
Acétate Na 7
Ac. acétique crist..... 300 ml
— Dissoudre à chaud, refroidir, compléter à 1 litre. par eau.

** α -naphtylamine 1 g
eau distillée 100 ml
— Dissoudre à chaud (5, 6 minutes)
ajouter : HCl concentré 5 ml,
compléter à 1 litre par eau.

Nous avons opéré avec une suspension très concentrée de germes, de manière à ce que tout le nitrate présent soit transformé, n'ayant pu mettre au point une méthode satisfaisante de dosage de cet ion. Des expériences préliminaires nous ont montré qu'avec une telle suspension le nitrate présent est utilisé en 2 à 3 heures, (suivant le donateur de H_2) la réaction de TILLMANS (à la diphenylamine) étant alors négative.

Les substrats utilisés ont été : la glycérine, le lactate et le succinate (ces deux dernières solutions acides étant neutralisées par $NaHCO_3$ solide). Ils sont introduits en large excès par rapport au nitrate, pour assurer une réduction totale de celui-ci.

Les variations de volume gazeux, sont lues de 15 en 15 minutes. On a réalisé en même temps des témoins sans nitrate et d'autres sans donateur de H_2 .

Les résultats que nous avons obtenus sont consignés dans le tableau VIII après avoir défalqué les valeurs obtenues dans les mêmes conditions pour les témoins.

TABLEAU VIII

**DIFFÉRENTS CORPS AZOTÉS PRODUITS PAR PS. CATTLEYAEOLOR
A PARTIR DU NITRATE**

Sources de carbone	N initial (NO_3^-) en μ Mol.	Différents corps azotés retrouvés (en μ Mol.)					% corps azotés produits		
		NO_3^-	NO_2^-	Gaz	NH_2OH	NH_4^+	Corps gazeux	NH_4^+	Nature inconnue
Glycérine t = 2 h.	10	0	traces env. 0,01	138 mm ³ soit 6,17	0	3	61,7	30	8,3
Lactate t = 2 h. 30	10	0	traces env. 0,04	132 mm ³ soit 5,90	0	3	59	30	11
Succinate t = 3 h.	10	0	0,2	109 mm ³ soit 4,86	0	3,26	48,6	32,6	16,8

A l'examen de ce tableau, on s'aperçoit que le nitrite formé en premier lieu à partir du nitrate ne s'accumule pratiquement pas ; il est immédiatement métabolisé pour donner de l'azote gazeux (et peut-être aussi des oxydes de N) et de l'ammoniaque. D'autre part, sauf en ce qui concerne le succinate, les taux de gaz et d'ammoniaque formés sont assez constants, quel que soit le donateur de H_2 . Enfin, une certaine partie de l'azote total formé n'est pas retrouvée sous forme minérale. Il ne faut cependant pas oublier que nous travaillons avec un grand nombre de corps bactériens, en présence de sources de carbone et d'azote. Il peut donc y avoir, malgré le temps relativement court qu'ont duré les expériences, un début de culture avec passage d'une partie du N présent sous forme organique. Il faut noter aussi que dans aucun cas nous n'avons pu mettre l'hydroxylamine en évidence. Le nitrite est donc réduit (une partie tout au moins) directement en ammoniaque.

Comme il a été signalé (p. 47), le dégagement gazeux produit à partir du nitrate peut être de l'azote gazeux, pur, mais le plus souvent c'est un mélange de N_2 et d'oxyde d'azote. Il est possible cependant d'éliminer NO de la phase gazeuse en utilisant la propriété qu'ont les solutions alcalines de sulfites de le fixer pour donner un composé d'addition [NAJJAR - 144].

En utilisant la méthode de WARBURG avec des fioles contenant dans leur cupule centrale 0,2 ml de KOH à 10 % et d'autres contenant, outre cette potasse, du sulfite neutre de sodium (ajouté sous forme solide : 0,02 à 0,03 g par cupule), la différence d'augmentation de pression dans les différents manomètres permet d'estimer les proportions d'oxydes qui sont les suivantes (tableau IX) :

Les dégagements de gaz sont exprimés en mm³ après avoir défalqué les chiffres obtenus pour les témoins.

TABLEAU IX

ÉVALUATION DE L'AZOTE ET DES OXYDES D'AZOTE FORMÉS A PARTIR DU NITRATE PAR PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR

Sources de C	GAZ mm ³ dégagés dans fioles avec KOH			Moyenne	mm ³ N dégagés dans fioles avec KOH + SO ₃ ⁻			Moyenne	Différence
Glycérine .	135	139	146	140	124	132	131	129	7,7 %
Lactate ...	127	136	129	131	121	118	122	120	8,3 %
Succinate .	109	98	112	106	90	97	95	94	11,3 %

Les faibles différences observées nous avaient tout d'abord semblé entrer dans la limite permise des erreurs d'expérience mais il faut remarquer que les valeurs des dégagements gazeux en présence de KOH + Na₂SO₃ sont **toutes** inférieures aux valeurs des dégagements correspondants effectués en fioles ne contenant que de la potasse. Il est donc vraisemblable qu'il y a formation de NO, bien qu'elle soit relativement faible. Il est possible aussi que NO formé soit réduit partiellement en N₂ au moment de sa formation avant de se dégager dans l'atmosphère de l'enceinte où est réalisée l'expérience. Malheureusement, nous n'avons pu disposer de NO pur pour vérifier l'utilisation possible de cet oxyde par *Ps. cattleyaecolor*.

2. — Evolution du nitrite.

Nous avons déjà signalé que, si *Ps. cattleyaecolor* utilisait parfois le nitrate comme seule source d'azote pour sa croissance, il était par contre incapable d'utiliser le nitrite et l'hydroxylamine. Cette incapacité peut avoir deux origines :

- Elle peut être due à la toxicité de la source d'azote à l'égard du germe,
- ou à son incapacité à métaboliser cette source, conséquence d'un manque d'enzyme spécifique ou de réactions d'oxydations couplées apportant l'énergie nécessaire.

En ce qui concerne *Ps. cattleyaecolor*, le nitrite, du moins à la concentration utilisée lors des essais de culture (0,1 %), n'a pas d'action toxique propre. En effet, si à un milieu contenant NO₂⁻ on ajoute une source azotée utilisable par *Ps. cattleyaecolor*, la croissance se produit avec disparition progressive du nitrite de ce milieu, accompagnée d'une légère production de gaz.

Ceci nous a amené à étudier l'action de bactéries non proliférantes sur le nitrite en présence de donateurs de H_2 convenables : glycérine, lactate et pyruvate. Nous avons utilisé ce dernier acide, en raison de l'existence en ce qui le concerne, d'un mode de réduction spécial du nitrite par *Ps. cattleyaecolor* que nous envisagerons plus loin.

On suit le mode opératoire déjà utilisé pour l'étude de l'action sur le nitrate, les $10 \mu \text{ Mol.}$ de NaNO_3 du diverticule latéral étant alors remplacées par $10 \mu \text{ Mol.}$ de NaNO_2 . Les expériences ont durées 2 heures. Les résultats sont consignés dans le tableau X.

TABLEAU X
DIFFÉRENTS CORPS AZOTÉS
PRODUITS PAR *PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR*
A PARTIR DU NITRITE

Sources de C et H	N initial (NO_2^-) ($\mu \text{ Mol.}$)	N retrouvé ($\mu \text{ Mol.}$)				% corps N produits		
		NO_2^-	Gaz	NH_2OH	NH_4^+	Gaz	NH_4	inconnu
Glycérine ...	10	3,8	4,05	0	1,8	65	29	6
Lactate	10	5	2,85	0	1,55	57	31	12
Succinate ...	10	5,9	2,55	traces	1,3	62	32	5,93
Pyruvate ...	10	7,3	1,48	(0,07)	1	55	37	7,93

De ces essais nous pouvons conclure que seules des considérations d'ordre énergétique empêchent l'attaque de NO_2^- par *Ps. cattleyaecolor* dans les conditions normales de culture : l'introduction massive de corps bactériens permettant cette attaque.

V. — MÉTABOLISME DE L'HYDROXYLAMINE

Ps. cattleyaecolor a un comportement à son égard absolument identique à celui qu'il montre en présence de nitrite, comme nous avons pu le constater en dosant :

- L'hydroxylamine restante et l'ammoniaque formée. Nous avons opéré en tubes de THUNBERG, sous vide, à 25° C. pendant 2 heures. On a auparavant laissé s'établir l'équilibre de température par un repos de 15 minutes à 25° C. Nous avons introduit dans chaque tube :
- 0,5 ml d'une solution 0,04 M de chlorhydrate d'hydroxylamine amenée à $\text{pH} = 7,4$ (soit $20 \mu \text{ Mol.}$).
- 1 ml de suspension bactérienne à 20 mg N/ml en tampon phosphaté de $\text{pH} = 7,4$.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XI.

TABLEAU XI

RÉDUCTION DE L'HYDROXYLAMINE EN AMMONIAQUE PAR PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR

Sources d'hydrogène	Hydroxylamine restante = n en μ Mol.	Hydroxylamine disparue = (20 - n) en μ Mol.	NH ₃ formé en μ Mol.
Glycérine	4,8	15,2	14,3
Lactate	6,8	13,2	12,5
Glucose	2,4	17,6	16,9

Ces résultats permettent de conclure qu'il y a donc une réduction stoechiométrique de l'hydroxylamine en ammoniaque. *Ps. cattleyaecolor* est capable d'effectuer cette réduction, du moins en suspension dense de « resting cells ».

VI. — ÉVOLUTION DES DONATEURS D'HYDROGÈNE

Nous verrons que *Ps. cattleyaecolor* possède des déshydrogénases spécifiques à l'égard de certains corps organiques hydrogénés, en particulier la glycérine, le lactate et le succinate utilisés dans nos expériences. En première approximation ces corps cèdent, grâce aux déshydrogénases spécifiques présentes, de l'hydrogène activé servant en dernier ressort à la réduction du nitrate, du nitrite, etc... Ils donnent d'autres corps pouvant eux-mêmes à leur tour être oxydés, décarboxylés, etc... car il faut se souvenir que l'on travaille en présence de bactéries lavées, mais restées entières et vivantes, avec leur multiplicité d'enzymes intracellulaires.

Il nous a donc semblé intéressant de suivre l'évolution de ces substrats carbonés :

1° soit en caractérisant les produits formés lors de la réduction des sources d'azote, ne pouvant les doser par des méthodes sûres et spécifiques,

2° soit en étudiant la marche de la réduction des composés azotés en présence d'inhibiteurs spécifiques des déshydrogénases (NaF).

I. — Recherche des produits formés.

En adoptant la technique de THUNBERG on répartit :

a - dans le tube :

- 0,5 ml de solution de substrat carboné 0,1 M neutralisée.
- 0,1 ml de NaNO₃ 0,1 M (ou de NaNO₂).
- 0,9 ml de tampon phosphaté de pH = 7,4.

b - dans le diverticule :

- 0,5 ml de suspension bactérienne à 2 mg N/ml en tampon phosphaté de pH = 7,4.

Après un quart d'heure de repos, on fait le vide, et laisse en contact 2 heures à 25° C.

Les produits que nous recherchons sont des acides organiques fixes, nous les avons identifiés chromatographiquement après extraction de l'éther.

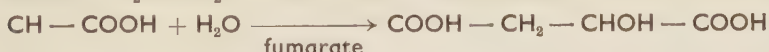
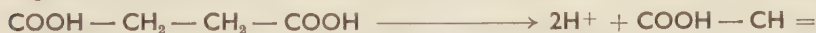
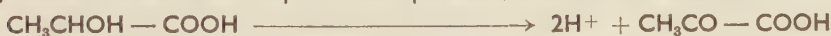
Nous avons aussi recherché les acides volatils en opérant en fioles d'ERLEN-MEYER bouchées où l'on faisait le vide après avoir introduit les solutions indiquées en quantité 10 fois plus grande. On recherchait alors les acides volatils éventuellement présents après entraînement à la vapeur d'eau.

Nous avons pu identifier les acides suivants (tableau XII) :

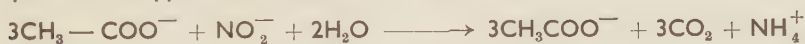
TABLEAU XII
**ACIDES ORGANIQUES ÉLABORÉS
PAR DES CELLULES NON PROLIFÉRANTES
DE PSEUDOMONAS CATTLEYAEOLOR
EN PRÉSENCE DE NITRATE OU DE NITRITE**

Sources d'azote du milieu	Sources de carbone du milieu		
	Glycérine	Lactate	Succinate
NO_3^-	Lactique Pyruvique Acétique	Lactique Pyruvique Acétique	Succinique Malique
NO_2^-	Lactique Pyruvique (traces) Acétique	Lactique Pyruvique Acétique	Malique Succinique

Il semble évident que les acides identifiés proviennent donc de la déshydrogénation normale des corps initiaux présents, suivant les réactions :



La présence d'acide acétique dans les fioles où le donneur d'hydrogène était constitué par la glycérine semblait devoir rester pour nous une énigme lorsque nous eûmes connaissance d'une publication de PICHINOTY et SENEZ [166] où ces auteurs démontrèrent qu'une bactérie anaérobie (*Desulfuvibrio desulfuricans*) était capable de réduire directement le nitrite en ammoniacque, en présence de pyruvate, suivant la réaction :



Nous n'avons pu, en ce qui concerne *Ps. cattleyaeolor*, vérifier quantitativement la stoechiométrie d'une telle réaction car le nitrite, ajouté comme source d'azote ou fourni à partir du nitrate, est réduit suivant 2 voies différentes et concomitantes : les stades terminaux de chacune étant l'azote (et des oxydes d'azote) et l'ammoniacque. Le dosage de si faibles quantités d'acide acétique, de plus, nous était pratiquement impossible.

Une telle réaction peut cependant se produire chez *Ps. cattleyaeolor* car, en présence de glycérine ou de lactate, on retrouve du pyruvate à la fin des expériences ; de même l'acétate a pu être mis en évidence quand on mettait la suspension de bactéries non proliférantes en présence de nitrite ou de pyruvate.

2. — Action d'inhibiteurs des déshydrogénases.

L'action d'inhibiteurs des déshydrogénases (fluorure, monoiodacétate) doit empêcher la réduction du nitrate (ou du nitrite) qui se comportent, en anaérobiose, comme accepteurs finaux de l'hydrogène. C'est ce que nous avons pu effectivement vérifier ainsi qu'en témoignent les expériences suivantes :

On opérait sur 3 séries de tubes de THUNBERG sous vide à 25° C. L'expérience a duré 2 heures.

Dans la première série on répartit :

a — Dans le tube :

- 0,5 ml de solution 0,2 M de donateur d'hydrogène
- 0,1 ml de solution 0,1 M de NaNO_3 (ou NaNO_2)
- 0,3 ml de solution 0,1 M de NaF (concentration finale 0,1 M)
- 1,1 ml de tampon phosphate de pH = 7,4

b — Dans le diverticule :

- 1 ml de suspension bactérienne à 3 mg N/ml dans du tampon phosphate de pH = 7,4.

Dans la deuxième série, le nitrate ou le nitrite sont simplement remplacés par 0,1 ml de solution de bleu de méthylène à 0,1 %. L'absence de décoloration objective l'action inhibitrice du fluorure sur les déshydrogénases (substrats utilisés : glycérine, lactate, succinate).

Dans les 2 séries de tubes, il a été réalisé des témoins, substrat seul et source azotée seule, avec et sans inhibiteur.

Nous avons recherché l'ammoniaque formée dans les séries 1 et 3 : la simple comparaison visuelle de l'intensité des colorations obtenues sous l'action du réactif de NESSLER est suffisamment suggestive pour prouver l'absence d'attaque du nitrate et du nitrite lorsque le processus de déshydrogénation est bloqué ; les tubes contenant l'inhibiteur sont à peine plus colorés que le témoin (bactéries + source d'azote seule) et nettement moins que la série ne contenant pas d'inhibiteur.

VII. — CONCLUSIONS

En résumé, ces dernières expériences prouvent que *Ps. cattleya* color possède l'équipement enzymatique nécessaire à la réduction du nitrate jusqu'au stade ammoniacal. Il lui est possible d'utiliser, du moins à l'état non proliférant, les différents corps intermédiaires de cette réduction, sauf l'azote gazeux.

Si le nitrite est incontestablement le premier stade de réduction, effectué grâce à la présence d'une nitrate-réductase, ce nitrite peut, lui, suivre plusieurs voies en même temps (car il ne s'accumule pas dans le milieu) :

a. — Il peut être réduit jusqu'au stade N_2 seulement (avec possibilité de formation concomitante d'oxydes d'azote) : une partie importante est ainsi métabolisée (environ 60 %).

b. — Il peut être réduit jusqu'au stade ammoniacal, avec passage possible par le palier de l'hydroxylamine : bien que ce corps n'ait jamais pu être mis en évidence lors des études de réduction du nitrite, *Ps. cattleya* color s'est révélé cependant capable d'attaquer l'hydroxylamine pour la transformer stoechiométriquement en ammoniac.

c. — Il est possible également que le nitrite puisse participer dans une certaine mesure à un processus de réduction directe en ammoniac sans intermédiaire, faisant intervenir en particulier l'acide pyruvique.

L'ammoniac formé dans tous les cas sert alors à l'élaboration des substances azotées organiques (acides aminés, protéides divers, pigment, etc...) en présence de sources de carbone utilisables.

B. — PASSAGE DE L'AZOTE MINÉRAL SOUS FORME ORGANIQUE.

Le dernier terme minéral de transformation des composés azotés minéraux par *Ps. cattleyaecolor* et utilisable en vue de synthèses organiques ultérieures est l'ammoniaque (en effet, il est incapable d'utiliser l'azote gazeux qu'il forme en même temps aux dépens des nitrites).

I. — ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

L'ammoniaque peut réagir avec

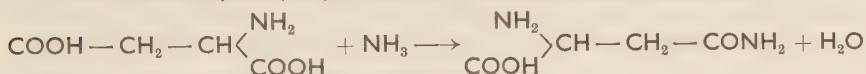
1. — Les acides organiques.

Pour former des amides.



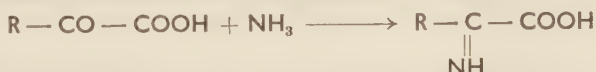
Ces acides pourront être des mono-acides, des diacides simples ou possédant d'autres groupements fonctionnels.

Avec l'acide aspartique par exemple, on obtiendra l'asparagine :



2. — Les alpha céto-acides.

Pour donner un imino-acide ultérieurement réduit en amino-acide.



L'hydroxylamine réagirait de même sur ces acides pour donner une oxime réductible en amino-acide ; ce phénomène a été mis en évidence chez les végétaux supérieurs par VIRTANEN [203].

Les corps ainsi obtenus (amides, amino-acides) peuvent alors, en présence de radicaux carbonés convenables, se transformer les uns dans les autres selon le processus de transamination pour former tous les acides aminés servant à l'édification des molécules protéiques indispensables à la croissance et à la multiplication de *Ps. cattleyaecolor*.

Il est évidemment difficile de suivre constamment dans le temps l'apparition et la présence de tous les intermédiaires de ces réactions. Il est par contre plus facile de caractériser après des temps variables de culture, les corps azotés organiques apparus dans les milieux ne contenant au départ l'azote que sous forme minérale utilisable.

Nous avons ainsi étudié l'élaboration d'acides aminés par *Ps. cattleyaecolor* cultivé sur des milieux à base d'acides organiques différents en présence de sources minérales d'azote et nous avons constaté que nous ne pouvions caractériser que les acides aminés libres existant dans les cultures. Il faut en effet faire une séparation complète entre les substances existant dans le milieu et celles se trouvant à l'intérieur même des cellules bactériennes. En général on trouve peu d'acides aminés libres à l'intérieur des corps bactériens ; nous l'avons observé en effectuant la chromatographie de solutions obtenues (par la méthode d'extraction de MACHEBOEUF) à partir d'extraits de *Ps. cattleyaecolor* préparés soit par autolyse de ces germes, soit par traitement de ceux-ci par les ultra-sons (action d'une fréquence de 12,7 Kc pendant 3×10 minutes). Les acides retrouvés le furent en faible quantité et en petit nombre : acide glutamique, glycocolle, traces d' α -alanine et d'histidine. Ceci semble

d'ailleurs assez logique, les amino-acides synthétisés ou apportés dans le milieu étant utilisés à la synthèse des protides et autres corps azotés (pigment) ; on ne doit donc s'attendre à aucune accumulation, du moins dans le milieu.

Nombreux sont les auteurs qui ont suivi la variation des acides aminés dans des milieux servant à la culture de microorganismes (FROMAGEOT et coll. - 65, MARCHAL et coll. - 131, etc...) ; il en est moins par contre qui ont étudié la formation et l'évolution de ces acides dans le milieu sous l'influence de divers facteurs : citons cependant les travaux de SENEZ [179] sur les bactéries sulfato-réductrices, de DAGLAY [43] et d'ABELSON [1] sur *Escherichia coli* ; ce dernier auteur en particulier, grâce à l'emploi de corps marqués, a pu suivre l'influence sur la génèse des amino-acides de différents intermédiaires du cycle tricarboxylique : les résultats obtenus étant en accord avec l'existence de ce cycle chez la bactérie étudiée. Tout récemment est paru aussi un mémoire de CEZAIRE et coll. [34] étudiant la croissance de *Ps. aeruginosa* en présence d'amino-acides.

Nous avons donc recherché les acides aminés élaborés par *Ps. cattleyae* color à partir de sources suivantes d'azote : NH_4NO_3 et NH_4Cl , en présence de différents substrats carbonés.

Nous utilisons le milieu synthétique de base déjà décrit (p. 35) auquel nous ajoutons 0,5 % de source d'azote. Après stérilisation on ajoute des solutions stériles et neutralisées des différents substrats carbonés de manière à obtenir une concentration finale de 1 %, le pH étant de 6,9.

Les tubes contenant 7 ml de milieu sont ensemencés et placés à l'étuve à 25° C. Les acides aminés formés sont extraits et chromatographiés (et s'il y a lieu identifiés aussi par électrophorèse) après 3, 7 et 15 jours de culture.

Les sources de carbone utilisées ont été : acétate, α -cétoglutarate, citrate, fumarate, lactate, malate, oxaloacétate, pyruvate, succinate, glucose, mannose et glycérine.

Tous ces corps nous ont été fournis par le commerce, à l'exception des acides oxaloacétique et α -cétoglutarique qu'il a fallu synthétiser*.

II. — SYNTHÈSE DE CERTAINES SOURCES DE CARBONE

Acide oxaloacétique : $\text{COOH} - \text{CO} - \text{CH}_2 - \text{COOH}$

Cet acide peut être obtenu de différentes façons, en particulier par les procédés de :

1. — BURRIS [29] : par hydrolyse du diéthylaloacétate de sodium.

2. — FENTON et JONES [60] qui oxydent l'acide malique par le mélange [sulfate ferreux - eau oxygénée à 20 vol. - acide sulfurique concentré] à basse température. Le mélange est ensuite extrait à l'éther. On réunit et évapore les solutions éthérées. Les cristaux sont lavés à l'eau froide et séchés sous exsiccateur ou sous vide.

C'est cette dernière méthode que nous avons employée. Il a été obtenu un produit dont le point de fusion instantanée au bloc Maquenne était de 185° C avec décomposition.

Il faut conserver cette substance au sec et à basse température car ses solutions sont peu stables.

* Nous remercions ici M. SOLEIL, Professeur de Chimie Organique, qui a bien voulu mettre sa compétence et son Laboratoire à notre disposition pour effectuer ces préparations.

Acide α -cétooglutarique : $\text{COOH} - (\text{CH}_2)_2 - \text{CO} - \text{COOH}$

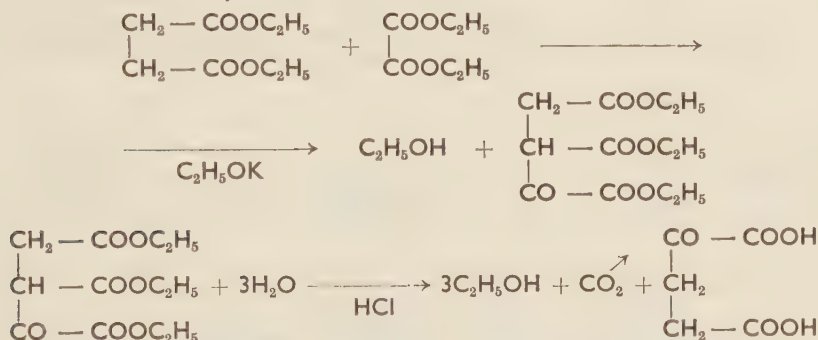
Il se prépare soit par :

1. — Action de HCl concentré sur l'oxalosuccinate d'éthyle [19].
2. — Action des alcalis sur des composés tels que :
 acide α - β dibromoglutarique
 acide α -bromoglutaconate d'éthyle
 acide α - α dibromoglutarate d'éthyle [84].
3. — Condensation de l'oxalate et du succinate d'éthyle en présence d'éthylate de potassium suivant la technique de FRIEDMAN et KOSOWER [64].
 Nous avons employé ce procédé qui nécessite des produits de départ assez faciles à obtenir.

On verse l'oxalate d'éthyle dans une ampoule contenant de l'éthylate K, on agite 10 minutes puis introduit le succinate d'éthyle. Après cristallisation, on lave à l'éther puis ajoute alors de l'acide chlorhydrique : l'oxalosuccinate d'éthyle se sépare sous forme d'une huile à extraire à l'éther ; après distillation de ce dernier, le résidu jaunâtre est additionné de HCl concentré, après repos on évapore, recueille les cristaux d'acide α -cétooglutarique, on les purifie par dissolution à chaud dans l'acétone puis on ajoute du benzène chaud jusqu'à formation d'un trouble ; l'acide recrystallise à froid.

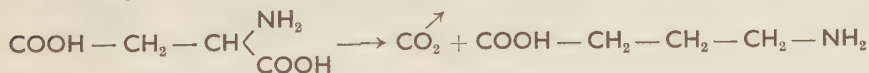
Tf instantanée au bloc Maquenne = 110-111° C.

Les réactions en jeu sont les suivantes :



III. — AMINO-ACIDES RETROUVÉS

Les acides aminés identifiés dans le milieu ont été rassemblés dans le tableau XIII. On s'aperçoit qu'ils s'y trouvent, qualitativement, en petit nombre. La majorité : α -alanine, acide glutamique et histidine se rencontrent d'une manière remarquablement constante. On a pu aussi caractériser, mais plus rarement, il est vrai, de la sérine, du glycolle, de l'acide aspartique et une tache « X ». Nous nous sommes demandé quelle était la nature exacte du corps responsable de cette tache ; il donnait des valeurs de Rf assez élevées (0,78 en phénol ammoniacal, 0,50 en butanol acétique) il ne migrerait d'autre part pas à l'électrophorèse, en tampon véronal de pH = 8,6 ce qui faisait supposer qu'il était mono-aminé, mono-acide. Finalement en réalisant des chromatogrammes témoins de tous les amino-acides dont nous disposions, nous avons pu identifier ce composé comme étant l'acide γ -aminobutyrique. Il est aisé d'imaginer sa formation par décarboxylation de l'acide glutamique.



ACIDES AMINÉS FORMÉS À PARTIR

(f.) = faible présence.

Source de carbone et d'azote	Jours	Acétate	α - céto-glutarate	Citrate	Fumarate	Lactate
Na NO ₃	3	acide glutamique (f.)	acide glutamique	acide glutamique (f.)	acide aspartique (f.)	acide glutamique
	7	idem (f.)	acide glutamique α -alanine	idem	acide aspartique acide glutamique	acide glutamique α -alanine
	15	idem	idem + sérine	idem + α -alanine (f.)	acide aspartique acide glutamique histidine	acide glutamique α -alanine tache X
NH ₄ NO ₃	3	acide glutamique α -alanine	acide glutamique α -alanine	acide glutamique sérine	acide aspartique α -alanine	acide aspartique acide glutamique α -alanine
	7	idem	idem + arginine tache X	idem + glycérine α -alanine	acide aspartique α -alanine acide glutamique tache X	acide glutamique α -alanine cystéine (f.) tache X
	15	idem + sérine	acide glutamique α -alanine ornithine tache X histidine	acide glutamique α -alanine histidine	acide glutamique histidine tache X	acide glutamique histidine tache X
NH ₄ Cl	3	acide glutamique α -alanine (f.)	acide glutamique (f.)	acide glutamique (f.)	acide aspartique	acide glutamique α -alanine
	7	idem (f.)	acide glutamique α -alanine sérine	idem + α -alanine asparagine	acide aspartique acide glutamique α -alanine	α -alanine acide glutamique tache X
	15	idem (f.)	acide glutamique α -alanine histidine tache X	acide glutamique α -alanine histidine	acide aspartique α -alanine histidine	acide glutamique alanine histidine

COMBINAISONS SUIVANTES

ate	Oxalo-acétate	Pyruvate	Succinate	Glycérine	Glucose	Mannose
de tique	acide glutamique	acide glutamique	acide glutamique α -alanine	acide glutamique	acide glutamique	acide glutamique
de tique	acide glutamique	acide glutamique	acide glutamique	idem	acide glutamique α -alanine	acide glutamique
de tique colle ne (f.)	acide glutamique sérine	acide glutamique α -alanine	acide glutamique sérine tache X	idem + tache X cystéine	acide glutamique α -alanine tache X	acide glutamique α -alanine (f.)
de tique nine	acide glutamique	acide glutamique	acide glutamique α -alanine	acide glutamique α -alanine	acide glutamique α -alanine	acide glutamique
de tique nine colle	acide glutamique α -alanine	acide glutamique cystéine α -alanine	acide glutamique α -alanine tache X	idem + tache X cystéine	idem + tache X cystéine	acide glutamique alanine cystéine
de tique nine	acide glutamique α -alanine ornithine	acide glutamique cystéine histidine	idem + cystéine	acide glutamique tache X cystéine histidine	acide glutamique α -alanine cystéine histidine	idem
de tique	acide glutamique	acide glutamique	acide glutamique	acide glutamique α -alanine	acide glutamique	acide glutamique
de tique nine)	acide glutamique α -alanine	acide glutamique α -alanine	acide glutamique alanine (f.)	idem + tache X	acide glutamique α -alanine tache X	acide glutamique α -alanine
de tique nine)	acide glutamique α -alanine	acide glutamique α -alanine histidine (f.)	acide glutamique histidine	acide glutamique α -alanine tache X histidine (?)	acide glutamique tache X histidine	acide glutamique α -alanine histidine

En effet, dans les milieux où cette tache X est mise en évidence, il y a toujours présence concomittante d'acide glutamique.

D'une façon occasionnelle, enfin, la présence d'acide aspartique, de cystéine, d'arginine et d'ornithine s'est manifestée. La génèse de la cystéine est encore malheureusement, en ce qui concerne *Ps. cattleyaecolor*, une inconnue totale ; quant à la présence d'arginine et d'ornithine, elle nous a suggéré, comme nous le verrons, la présence d'un groupe d'enzymes réalisant à l'aide de ces acides un cycle particulier, celui de KREBS-HENSELEIT.

C. — AZOTE ORGANIQUE.

I. — UTILISATION DES ACIDES AMINÉS

Nous avons prouvé que *Ps. cattleyaecolor* était capable d'utiliser différentes sources d'azote minéral pour assurer sa croissance, les transformant en molécules organiques nécessaires à celle-ci. Le premier stade d'élaboration de ces protéides est la synthèse des acides aminés. Elle a été mise en évidence par la caractérisation dans des milieux de culture contenant, outre l'azote sous forme minérale convenable, des sources de carbone apportant carbone et énergie nécessaire à la synthèse de la matière vivante. Cependant les acides aminés retrouvés dans ces milieux ne renseignent qu'incomplètement sur le pouvoir de synthèse total de *Ps. cattleyaecolor*, et comme corollaire sur celui de leur utilisation, de leur catabolisme.

C'est pourquoi il nous a semblé utile d'étudier le comportement de *Ps. cattleyaecolor* sur ce groupe de corps.

1. — En considérant l'influence de ces amino-acides sur la croissance.

2. — En jugeant leurs capacités d'utilisation en envisageant successivement les 3 grandes voies métaboliques de ces acides chez les êtres vivants en général :

- la désamination
- la décarboxylation
- la transamination.

1. — Influence de certains amino-acides sur la croissance de *Ps. cattleyaecolor*.

Il est évident que, dans des conditions d'expérience aussi semblables que possible, toute substance n'est pas identiquement assimilée par un micro-organisme donné. En ce qui concerne les amino-acides, il faut considérer 2 cas :

1. — Celui où l'acide aminé est à la fois la source de carbone et d'azote. Dans ce cas, la croissance sera fonction de l'assimilation totale (traduisant le pouvoir d'utilisation de l'ensemble de la molécule) de celui-ci.

2. — Celui où il intervient seulement comme source d'azote ; le germe trouvant par ailleurs dans le milieu un donateur de carbone et d'hydrogène utilisable. La croissance à ce moment ne sera plus que le reflet de la présence (ou de l'absence) des enzymes catalysant le métabolisme de la fraction azotée par les processus classiques (désamination, etc...).

Nous nous sommes borné à étudier l'influence des amino-acides sur la croissance de *Ps. cattleyaecolor* dans le cas où ceux-ci constituent dans le milieu la seule source énergétique et plastique (premier cas) ; il est possible d'approcher quantitativement avec beaucoup de rigueur l'utilisation de l'azote aminé (second cas) en étudiant les bioréactions en présence de cellules non proliférantes.

Pour étudier la croissance, nous avons eu recours à la méthode biophotométrique (biophotomètre enregistreur de BONNET-MAURY et JOUAN).

Protocole.

Dans les cuves du biophotomètre sont répartis 7 ml de tampon phosphatique 0,066 M (pH = 7) puis 1 ml de solution 0,05 M d'acide aminé, neutre et stérilisée par filtration sur bougie.

Les bactéries proviennent d'une culture sur gélose peptonée ordinaire, en fioles de ROUX ; elles sont recueillies, lavées à 3 reprises dans l'eau distillée puis finalement mises en suspension dans le tampon phosphate. On réalise alors un ensemencement des cuves de manière que le milieu soit encore suffisamment limpide pour laisser passer encore une grande partie du faisceau lumineux qui les traverse.

La croissance de *Ps. cattleyaecolor* a été testée en présence de :

*Glycocolle	Lysine
L-alanine	L-arginine
D-L-alanine	L-phénylalanine
α -alanine	L-tyrosine
L-valine	L-tryptophane
L-leucine	L-histidine
Sérine	Proline
L-méthionine	Acide D-aspartique
L-cystéine	Acide D-L-aspartique
Acide L-glutamique	D-arginine

Résultats.

D'après les courbes obtenues (fig. 4 et 5) nous voyons que peu de ces amino-acides peuvent être utilisés par *Ps. cattleyaecolor* pour sa croissance. Dans tous les cas d'ailleurs, celle-ci ne débute qu'après un certain temps de latence, ce qui indique une adaptation du germe au substrat.

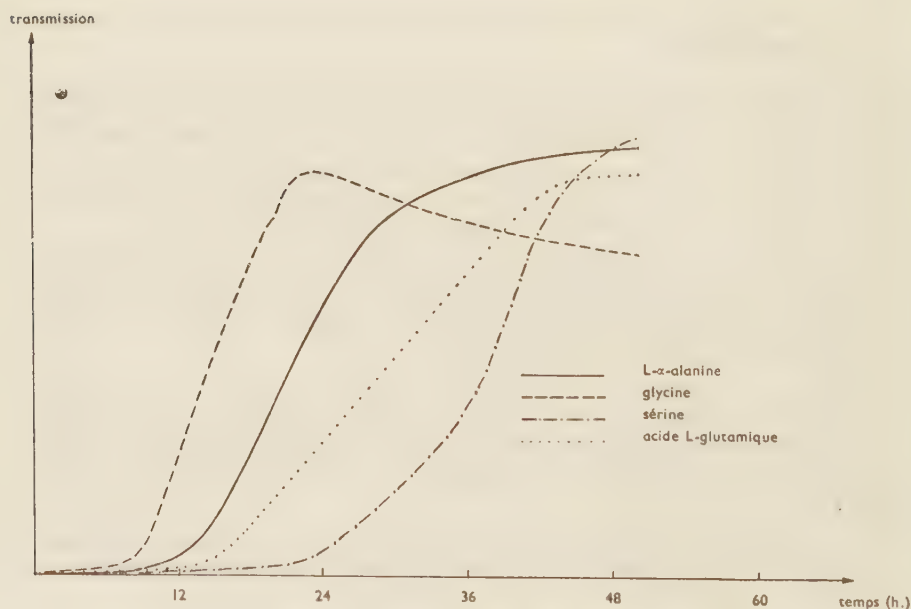


Fig. 4. — Influence de divers amino-acides sur la croissance de *Pseudomonas Cattleyaecolor*

* Les composés non précédés des lettres caractéristiques sont ou des racémiques ou ne possèdent pas de C asymétrique.

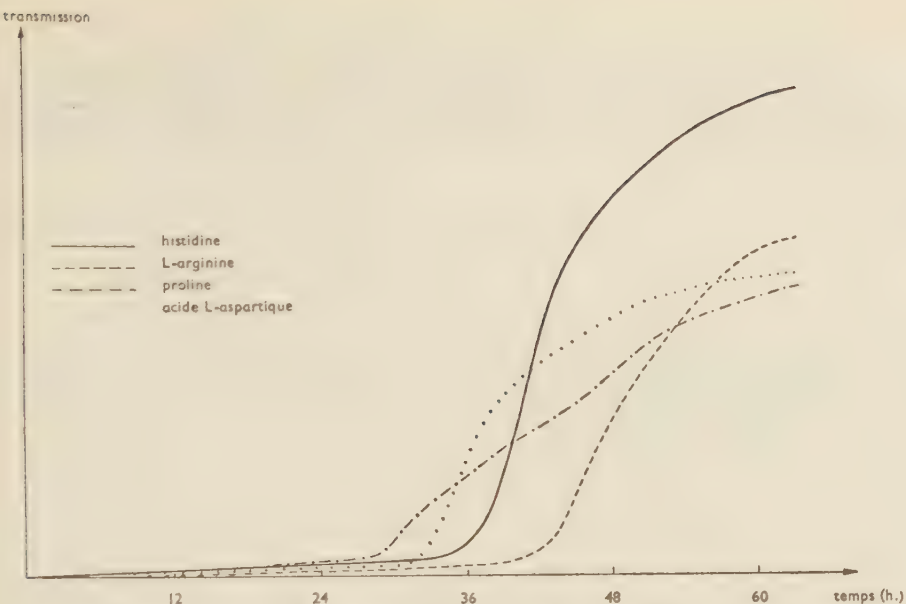


Fig. 5. — Influence de divers amino-acides sur la croissance de *Pseudomonas Cattlejaecolor*

Les seuls acides utilisés sont par ordre décroissant d'intensité de développement :

(L)-alanine (remarquons que *Ps. cattlejaecolor* est absolument incapable d'utiliser la β -alanine).

Ac. (L) glutamique

Glycocolle

Histidine

Ac. aspartique

Proline

(L)-arginine

Sérine : bien que la croissance avec cet acide soit possible, nous n'avons malheureusement pas pu établir de courbe car dans les conditions d'expérience, on obtient très rapidement une précipitation dans le milieu. Pour obtenir une courbe, il nous a fallu utiliser de l'eau distillée, la précipitation étant due au phosphate présent.

L'ensemble de ces expériences appelle plusieurs remarques :

1. — En ce qui concerne les acides mono-aminés-mono-carboxyliques, *Ps. cattlejaecolor* n'utilise que les trois premiers termes (α -alanine, glycocolle et sérine), il n'est pas de même de la β -alanine (dont nous verrons plus loin qu'elle n'est absolument pas désaminée). L'allongement de la chaîne carbonée (valine, leucine) ou la présence de soufre (cystéine, méthionine) diminuent le pouvoir d'utilisation de l'acide.

2. — Histidine et proline mises à part, *Ps. cattlejaecolor* semble incapable d'utiliser les acides aminés à chaîne complexe, linéaire (lysine) ou cyclique (tyrosine, tryptophane). L'arginine cependant permet la croissance après un long moment de latence. Il faut comme nous le verrons, en trouver une explication dans la dégradation de cet acide aminé avec production de métabolites utilisables : l'ammoniaque et l'acide gamma-aminobutyrique.

3. — Le pouvoir rotatoire a aussi une influence certaine : chez tous les acides utilisables pour la croissance, la forme L des acides se montre plus favorable que les formes DL ou D.

Signalons que l'étude de l'influence des isomères optiques des acides aminés sur la croissance d'autres bactéries chromogènes avait déjà été entreprise, au Laboratoire, sur d'autres germes chromogènes par Ph. LASSEUR [102].

2. — La désamination chez *Pseudomonas cattleyae* color.

L'étude de la croissance de *Ps. cattleyae* color en présence de différents amino-acides nous renseigne sur le pouvoir d'utilisation de ceux-ci. Mais leurs voies de dégradation chez les êtres vivants sont multiples. La première d'entre elles, la désamination, peut s'effectuer elle-même par les divers processus suivants :

1. — Désamination oxydante avec formation d'ammoniaque et d'un acide cétonique.



C'est la voie principale de dégradation chez les organismes animaux (travaux de EMBDEN, KREBS, NEUBAUER, etc...).

L'acide cétonique formé peut lui-même évoluer à son tour vers une réduction, une décarboxylation, etc.

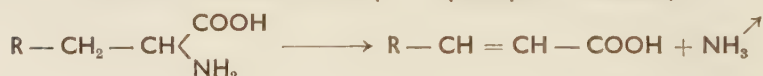
2. — Désamination réductrice.



3. — Désamination et hydrolyse.



4. — Désamination désaturante (ac. aspartique - histidine).



5. — Désamination couplée (réaction de STICKLAND).



Ces 4 derniers modes de désamination se rencontrent plus rarement, chez les animaux du moins.

Chez les bactéries, au contraire, le mode de désamination est fonction de l'espèce bactérienne et (même à l'intérieur d'un type bactérien donné) des conditions de milieu, de la nature de l'acide aminé, etc... *Escherichia coli* par exemple [168] désamine l'alanine, la sérine, l'acide glutamique par voie oxydative, tandis que l'acide aspartique est désaminé par désaturation avec production d'acide fumarique (action d'une aspartase).

De son côté la réaction de STICKLAND a une grande importance chez les bactéries anaérobies.

Nous nous sommes donc proposé d'étudier le pouvoir de désamination de *Ps. cattleyae* color. Nous avons pu constater que, quelle que soit la voie empruntée, il y a libération de NH_3 . Si cette libération d'ammoniaque s'accompagne d'une consommation d'oxygène, on peut prévoir que la voie empruntée est la voie oxydative ; il est à ce moment possible de mettre en évidence dans le milieu l'acide cétonique formé ou un produit de transformation de celui-ci si la bactérie l'attaque à son tour. Enfin, en travaillant sous atmosphère d'azote ou en présence d'un inhibiteur d'oxydation (arsénite) on peut arrêter spécifiquement le processus oxydatif de désamination sans toucher aux autres.

a. — Etude en resting-cells.

α — Dans une première série d'expériences, nous avons étudié la désamination par des cellules non proliférantes de *Ps. cattleyaecolor*, suivant la méthode de WARBURG, ce qui nous a permis de suivre la consommation d'oxygène. Pour cela, nous répartissions :

- 1 — Dans la cupule centrale :
— 0,2 ml de KOH à 10 %.
- 2 — Dans l'espace annulaire :
— 2,7 ml de suspension bactérienne en tampon phosphaté de pH = 8 soit 30 mg de N bactérien par fiole.
- 3 — Dans le diverticule latéral :
— 0,3 ml de solution 0,1 M amino-acide (30 μ Mol.).

On mélange après 1/4 d'heure de contact (équilibration des températures). La durée des expériences a été de 3 heures. Les lectures étaient faites toutes les 15 minutes. Température : 28° C.

Nous avons travaillé à pH = 8 car l'optimum d'activité des désaminases se situe vers la zone alcaline des pH [GALE - 1944].

Le dosage de l'ammoniaque dégagé a été effectué par la méthode de FOREMAN (modification de RAYNAUD et GROS - Cf p. 21). Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XIV ; les valeurs de l'endogène (oxygène consommé et ammoniaque produit par la suspension bactérienne dans le tampon, sans substrat), ont été défalquées.

TABLEAU XIV

DÉSAMINATION D'AMINO-ACIDES PAR PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR - CONSOMMATION D'OXYGÈNE ET DÉGAGEMENT D'AMMONIAQUE

Amino-acides	O ₂ consommé (μ Mol.)	NH ₃ formé (μ Mol.)
Glycine	13,2	12,7
α -alanine (L +)	58,5	29,3
Sérine (DL)	21,7	17,4
Ac. aspartique (L +).....	5,1	5,4
Ac. glutamique (L +)	14,3	4,6
Cystéine	22,9	6,7
Arginine (L +)	13,2	37,5
Tryptophane (L —)	4,5	3,9
Tyrosine (L —)	13,8	1,6
Alanine, leucine, valine, histidine, phénylalanine, lysine, méthionine	0 < — < 3	0 < — < 1,6

On y constate tout d'abord que les acides les plus désaminés sont ceux qui seuls ont permis la croissance de *Ps. cattleyaecolor*, et dont l'étude a été faite par voie biophotométrique, tandis que la β -alanine, la lysine, la valine etc... ne sont pratiquement pas touchées.

Les acides désaminés le sont par voie oxydative : ceci apparaît nettement pour certains d'entre eux (glycine, acide aspartique) moins pour d'autres (acide glutamique, arginine). Mais, de toute façon, à toute libération d'ammoniaque correspond une quantité d'oxygène consommé aussi importante (aux erreurs d'expérience près) ; elle est quelquefois de beaucoup supérieure, ce qui indique une transformation ultérieure du métabolite formé. Seule l'arginine fait exception.

Pour définir d'une façon indiscutable le mécanisme oxydatif de la transformation des acides aminés que *Ps. cattleyaecolor* peut désaminer, nous avons recommencé les expériences en suivant le même protocole, en utilisant les amino-acides suivants :

α -alanine
glycine
sérine
acide glutamique
arginine
tyrosine

et nous avons opéré sous atmosphère d'azote et également en présence d'arsénite de potassium.

β — Sous atmosphère d'azote :

L'azote, barbotant tout d'abord dans une solution alcaline fraîche de pyrogallol passait ensuite, pendant 10 minutes dans les fioles de WARBURG de manière à réaliser à l'intérieur de celles-ci une atmosphère inerte sans oxygène. Après 3 heures, nous n'avons obtenu dans les différents manomètres, aucune dépression supérieure (à 5 % près) à celle observée dans le système manométrique contenant le témoin endogène. De même, le dégagement d'ammoniaque fut égal ou très légèrement supérieur (maximum : $2,2 \mu$ Mol. NH_3) à celui du témoin.

Une exception a été observée avec l'arginine, où l'on a retrouvé 28μ Mol. de NH_3 libérées.

— Action de l'arsénite de potassium.

Dans une série de travaux [155 - 156] NISMAN et coll. prouvèrent que, chez les bactéries anaérobies, l'arsénite inhibe fortement et spécifiquement l'action des amino-acidedéshydrogénases : dans la réaction de STICKLAND en particulier courante chez ces germes, il n'empêche pas la désamination du substrat donneur mais inhibe l'enzyme assurant la réduction de l'acide aminé récepteur de H_2 .

L'arsénite, de plus, empêche l'oxydation ultérieure de l'acide cétonique formé.

Dans nos expériences, dont les résultats sont rassemblés dans le tableau ci-après (tableau XV) nous avons utilisé cet inhibiteur aux concentrations finales 0,002 M et 0,0005 M. Les chiffres faisant l'objet du tableau XV ont été obtenus en défalquant les valeurs des témoins.

γ — Discussion des résultats :

De la confrontation des résultats obtenus dans ces expériences, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

TABLEAU XV

**INHIBITION DE LA DÉSAMINATION DE QUELQUES AMINO-ACIDES
PAR PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR
SOUS L'INFLUENCE DE L'ARSÉNITE**

Amino-acides	Glycine	Alanine	Sérine	Acide glutamique	Arginine
Témoin (μ Mol.) ..	13,2 O ₂ 12,7 NH ₃	58,5 O ₂ 29,3 NH ₃	21,7 O ₂ 17,4 NH ₃	14,3 O ₂ 4,6 NH ₃	13,2 O ₂ 37,5 NH ₃
Inhibiteur	Arsénite 0,002 M				
μ Mol. O ₂ cons. ..	0	3,3	0,9	0	1,4
% inhib.	100	94,4	96	100	90,1
μ Mol. NH ₃ lib. ..	0	2	0,7	0	17,4
% inhib.	100	93,2	96	100	55
Inhibiteur	Arsénite 0,0005 M				
μ Mol. O ₂ cons. ..	0	9	2,4	0,6	2,1
% inhib.	100	84,6	88,6	96	86
μ Mol. NH ₃ dégag.	1,4	6,5	2,1	0,3	28
% inhib.	95,4	78	88	92,6	27

I — Le glyocolle et l'acide aspartique sont désaminés sans transformation ultérieure des produits formés, du moins pendant la durée de l'expérience :



En ce qui concerne la glycine, l'acide formé (acide glyoxylique) peut être mis en évidence par ses propriétés réductrices (mise en évidence en utilisant la réaction de TOLLENS).

Pour l'acide aspartique, l'acide oxaloacétique qui a pris naissance est caractérisé par chromatographie sous forme de sa dinitrophénylhydrazone (accompagnée d'ailleurs de celle de l'acide pyruvique, provenant d'une décomposition de l'acide oxaloacétique).

2 — Avec la sérine, le rapport $\frac{O_2 \text{ cons.}}{NH_3 \text{ libéré}}$ est d'environ 1,25 c'est-à-dire

supérieur à la limite de marge d'erreurs acceptable. Nous n'avons jusqu'ici pas pu déterminer l'origine de cet excès de consommation d'oxygène (peut-être y aurait-il oxydation de l'acide cétonique formé avec production d'acide glycolique).

3 — De même pour la cystéine, où ce rapport $\frac{O_2}{NH_3}$ est de 3,5, le sort de

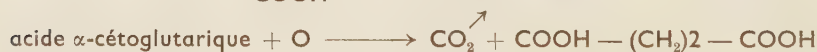
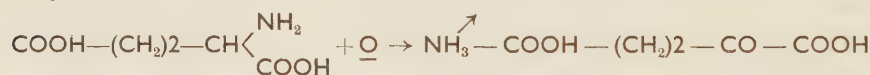
cet acide reste un problème pour nous, le seul corps caractérisé étant l'acide pyruvique en faible quantité dans le milieu. Il peut provenir d'une hydrolyse de la cystéine qui donne naissance à $SH_2 + NH_3 +$ acide pyruvique.

4 — La tyrosine ne se désamine que très faiblement. La consommation d'oxygène est cependant importante : il y a probablement oxydation de la partie aromatique : *Ps. cattleyaeicolor* possède en effet une tyrosinase. Ce germe cultivé en milieu à base de tyrosine donne au bout de quelques jours une coloration brune, due à la formation de polymères cycliques condensés (genre mélanine) provenant d'une oxydation de la tyrosine. La présence de tyrosinase est d'ailleurs, d'après BRISOU [26] une caractéristique de beaucoup de représentants de genre *Pseudomonas*.

5 — Avec l'acide glutamique le rapport $\frac{O_2}{NH_3}$ est à peu près égal à 3 et par

chromatographie sur papier nous avons mis en évidence les acides succinique et malique.

Il nous est possible de représenter de la manière suivante l'enchaînement des réactions qui se produisent et qui rendent compte de la valeur du rapport $\frac{O_2}{NH_3}$ et de l'origine des spots d'acides caractérisés.



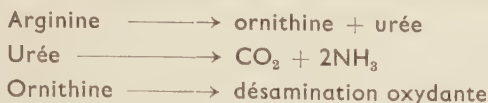
Nous avons montré précédemment que *Ps. cattleyaeicolor* (p. 53) était capable d'oxyder le succinate en malate, avec passage probable par le fumarate : l'oxygène provenait alors du nitrate. Lorsque nous étudierons le métabolisme carboné de ce germe, nous verrons qu'il est capable de se développer en utilisant le fumarate comme source de carbone, produisant en particulier du malate aux dépens de celui-ci.

8 — Cas de l'arginine :

Le rapport $\frac{O_2}{NH_3}$ est ici de 1/3. D'autre part, l'étude de la désamination

sous atmosphère d'azote ou en présence d'arsénite montre que la libération d'ammoniaque n'est, dans ces deux cas, diminuée que de 1/3 environ (27 %). Ceci prouve qu'un seul atome d'azote est libéré par la désamination ou oxydation. Les deux autres le sont vraisemblablement par hydrolyse avec formation intermédiaire d'urée, car comme il le sera démontré dans une autre partie de ce travail, *Ps. cattleyaeicolor* possède une uréase.

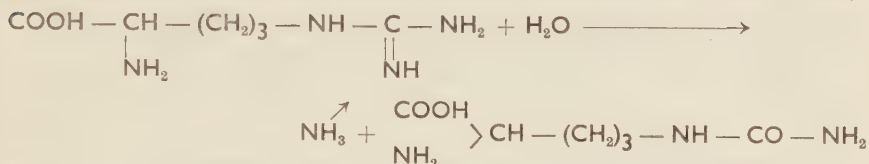
Avec l'arginine on observerait donc les réactions suivantes :



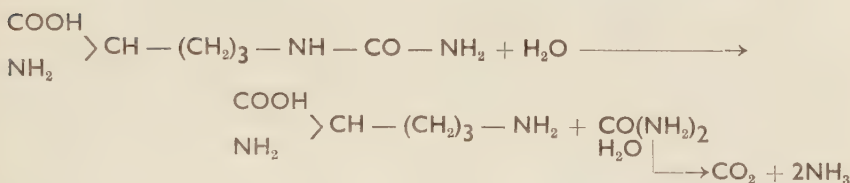
Effectivement, il est possible de mettre en évidence, par chromatographie, la présence d'ornithine dans la solution, et aussi celle d'un spot faible mais constant que nous avons identifié précédemment comme étant celui de l'acide γ -aminobutyrique déjà mentionné et qui provient de la désamination oxydative de l'ornithine.

Cette transformation de l'arginine suggère donc, outre la présence d'une uréase, celle d'une arginase capable d'effectuer la scission arginine $\longrightarrow$ ornithine et urée, en un seul temps.

Mais cette scission peut aussi s'effectuer en 2 temps. Dans le premier temps, on observe une désimination de l'arginine avec apparition de citrulline. Dans le second, la citrulline est transformée en ornithine, CO_2 et NH_3 , ceci sous l'influence de 3 enzymes distincts (arginine-désimidase, citrullinase, uréase).



et



Ce mode de dégradation se rencontre chez de nombreuses bactéries : *Clostridium perfringens* [178], *Streptococcus faecalis* [160 - 161], *Pseudomonas aeruginosa* [80 - 183], *B. roseus fluorescens* [128].

En ce qui concerne *Ps. cattleyae*color, il est possible de constater l'existence d'ornithine mais non de citrulline, si l'on met en présence l'arginine avec ces « resting-cells ». Nous nous sommes assuré que cet acide était également métabolisé, et nous avons pu ainsi observer que *Ps. cattleyae*color pouvait transformer l'arginine ou la citrulline en CO_2 et NH_3 .

Nous avons opéré en tubes de Thunberg sous azote, en tampon phosphate 0,2 M de pH = 6,5 (ceci pour réduire au maximum la réaction de désamination oxydante concomittante), en mettant en présence (volume final 3 ml) 10 μ Mol. d'acide-amino et une quantité de bactéries correspondant à 30 mg N bactérien. La disparition de l'acide aminé était appréciée par chromatographie (Rf en phénol ammoniacal, arginine = 0,56, citrulline = 0,41, ornithine = 0,27) ; celle-ci est complète pour tous ces acides entre 2 h. 30 et 3 h.

Les quantités d'ammoniaque dosées par la méthode de CONWAY ont été les suivantes :

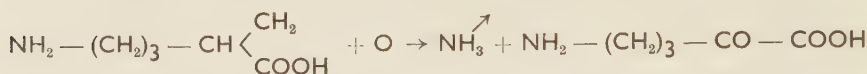
21,3	μ Mol.	pour l'arginine
10,8	—	la citrulline
2,1	—	l'ornithine

Ces résultats concordent donc avec ce que laissent prévoir les réactions étudiées.

C'est par hydrolyse que deux des trois atomes d'azote sont libérés à partir de l'arginine alors que le troisième l'est par désamination.

Un point reste encore à éclaircir, il réside dans la présence d'acide γ -aminobutyrique. On peut envisager sa formation de la manière suivante :

Il y aurait d'abord désamination oxydante de l'ornithine :



Puis décarboxylation de l' α -céto acide formé :



Les quantités d'oxygène consommé et d'ammoniaque dégagée à partir de l'ornithine dans les conditions expérimentales décrites pour l'étude de la désamination des autres amino-acides, les valeurs des témoins étant toujours défaltées, ont été les suivantes (tableau XVI) :

TABLEAU XVI

**DÉSAMINATION OXYDATIVE DE L'ORNITHINE
PAR PSEUDOMONAS CATTLEYAEOLOR
EN PRÉSENCE D'AZOTE OU D'ARSÉNITE**

Conditions expérimentales	O ₂ (μ Mol.) consommé	NH ₃ (μ Mol.) dégagé	% d'inhibition
Conditions normales (at- mosphère d'air)	16,6	12,1	—
Atmosphère d'azote	—	1,3	89,3
AsO ₃ --- 0,002 N	1,1	0,9	93,6 - 92,6

Ces résultats apportent une confirmation à l'hypothèse que nous venons d'énoncer car nous n'avons pu caractériser d'acide γ -aminobutyrique en présence d'inhibiteur ou d'une atmosphère inerte. De plus, le rapport $\frac{\text{O}_2}{\text{NH}_3} = 1,37$

(alors qu'il devrait être théoriquement de 2) mais il est possible que le céto-acide formé ne soit pas intégralement décarboxylé dans le temps et les conditions de l'expérience, les décarboxylases ayant en général un optimum d'action dans les zones de pH acide compris entre 5 et 6.

b. — Mesure de l'ammoniaque dégagée au cours de la croissance.

Nous venons de voir qu'à l'état de cellules non-proliférantes, et dans les conditions de vie normale (aérobiose) les seuls acides aminés permettant la croissance étaient alors aussi les seuls à être désaminés d'une manière nette par *Ps. cattleyaeolor*, par voie oxydative uniquement.

Dans ce deuxième groupe d'expériences, nous nous sommes efforcé de suivre l'intensité de la désamination en fonction du temps, en opérant dans un milieu synthétique où l'acide aminé représente l'unique source de carbone et d'azote.

Des séries de tubes, contenant 7 ml de milieu de base MB et auquel sont ajoutés 2 ml d'une solution 0,1 M d'acide-amino (soit 200 μ Mol.) sont commencés avec 1 ml d'une suspension de *Ps. cattleyaecolor* à 2 mg N/ml.

Cette suspension était obtenue à partir d'une culture de 18 h. en gélose peptonée effectuée en boîtes de ROUX. Elle est préparée puis titrée selon le procédé déjà utilisé pour la préparation des « resting-cells ».

L'ammoniaque est dosée par la méthode de FOREMAN, sur 2 ml de culture, après 1, 4 et 10 jours de séjour à 25° C. Les valeurs des témoins (suspensions bactériennes) ont été comme d'habitude, déqualifiées.

Les résultats obtenus ont été les suivants (tableau XVII) :

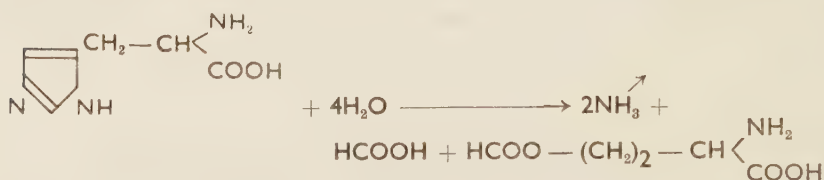
TABLEAU XVII

**AMMONIAQUE LIBÉRÉE AU COURS DU TEMPS
PAR PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR
CULTIVÉ EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS AMINO-ACIDES**

Amino-acides	NH ₃ en μ Mol.		
	1 jour	4 jours	10 jours
Glycine	≤ 0,5	11,4	29,5
α -alanine	»	17,3	58,6
Leucine	»	7,1	0
β -alanine	»	2,6	0
Sérine	»	20,7	168
Cystéine	»	11,5	10,9
Méthionine	»	0	5,8
Phénylalanine.....	»	3,8	4
Tyrosine	»	9	34,6
Tryptophane	»	0,5	75,1
Ac. aspartique	»	14,7	30,1
Ac. glutamique	»	20,5	30
Arginine	»	92,2	314
Histidine	»	17,8	359
Lysine	»	11,1	29,8

Les chiffres obtenus sont en général superposables à ceux fournis par la méthode de WARBURG. Il faut toutefois remarquer que certains acides peu utilisés au début, le sont d'une façon plus importante au bout de 10 jours. C'est le cas de la sérine, du tryptophane et surtout de l'histidine chez qui l'attaque est tardive mais très puissante.

Cette importante production d'ammoniaque peut étonner à première vue, mais il a été signalé que certains organismes bactériens [50] y compris une espèce du genre *Pseudomonas* (*Ps. fluorescens*, TABOR et HAYAISHI [190]) sont capables d'ouvrir le cycle imidazolique de l'histidine, avec production d'ammoniaque et d'acide glutamique (pouvant être ultérieurement désaminé) selon le schéma suivant :



Une telle transformation a dû se produire dans nos expériences. Nous aurons l'occasion de le montrer lorsque nous étudierons la transamination chez *Ps. cattleyaecolor*, qui nous a révélé la présence d'acide glutamique dans des milieux contenant de l'histidine, et où la bactérie s'est développée.

Les mêmes expériences, effectuées sur les amino-acides les plus utilisés mais en anaérobiose stricte, n'ont donné lieu qu'à une libération très faible d'ammoniaque qui ne s'accompagnait d'aucune croissance visible.

Tout semble donc affirmer que la désamination qui représente chez *Ps. cattleyaecolor* un mode très important d'utilisation des amino-acides, a lieu uniquement suivant un processus oxydatif (ou déshydrogénant).

3. — La décarboxylation.

Ce mode de dégradation des amino-acides est également assez fréquent chez les bactéries. C'est ainsi que les anaérobies transforment nombre d'acides en amines, d'odeur caractéristique. Ces réactions peuvent être représentées par le schéma suivant :



Les bactéries aérobies contiennent de même des décarboxylases actives sur différents amino-acides [EPPS, GALE, NAJJAR, TAYLOR, etc..., 51 - 68 - 146 - 193].

La réaction de décarboxylation est irréversible et son intensité peut être facilement suivie dans le temps par le dégagement de CO_2 auquel elle donne lieu.

Nous avons suivi ce dégagement gazeux par la méthode manométrique de WARBURG. Ceci est rendu possible parce que les décarboxylases ont en général un optimum d'action à des pH compris entre 4 et 6 (GALE) et que à pH inférieur à 5,5, CO_2 ne se dissout pratiquement pas dans la solution. Il se retrouve donc en quasi totalité dans la phase gazeuse ; il ne commence à se dissoudre qu'à $\text{pH} > 5,5$ (pour donner un bicarbonate), le pourcentage de dissolution croissant avec le pH. L'emploi de tampons acides a de plus l'avantage

de minimiser l'action des désaminases également présentes dans les corps bactériens.

Les amino-acides testés ont été :

— Acide aspartique et glutamique, arginine, lysine, histidine, tryptophane et tyrosine.

Les expériences ont été effectuées en fiole de WARBURG, sous atmosphère d'azote à (*) 28° C en présence de tampon acétate 0,2 M de pH = 4,6 (25,5 ml acide acétique 0,2 M + 24 ml acétate Na 0,2 M, eau q.s.p. 100 ml). Les bactéries provenaient d'une culture de 18 heures, sur milieu L₁ gélosé. Après lavages, elles étaient mises en suspension dans le tampon acétate et réparties dans les fioles. On réalisait ainsi les systèmes suivants :

a - Dans la cupule centrale :

— 0,2 ml tampon acétate (pas de potasse évidemment dans ces expériences, puisqu'on cherche à mesurer un dégagement de CO₂).

b - Dans l'espace annulaire :

— 2,8 ml suspension bactérienne en tampon acétate, soit 10 mg d'azote bactérien/fiole.

c - Dans le diverticule :

— 0,2 ml de solution 0,1 M d'acide-amino (20 μ Mol.).

On faisait passer un courant d'azote pendant 10 minutes et on mélangeait. Les lectures ont été faites toutes les 15 minutes.

Après 1 heure de contact, les dégagements gazeux étaient à peu près nuls dans tous les manomètres sauf dans celui où le substrat était constitué par l'acide glutamique.

Seul donc, cet acide est décarboxylé, suivant la réaction :



Par chromatographie sur papier, de la solution, après élimination des bactéries, nous avons effectivement obtenu les spots, bien séparés de l'acide glutamique restant et de l'acide γ-aminobutyrique formé.

Il ne nous a cependant pas été possible de vérifier la stoechiométrie de la décarboxylation de l'acide glutamique : c'est en effet une réaction assez lente, et, pour obtenir une réaction totale dans un temps assez court (2 heures) il faut employer une faible quantité de substrat (10 μ Mol.) et une suspension dense de bactéries (35 mg d'azote bactérien). A 10 μ Mol. d'acide glutamique disparues correspondait un dégagement de 8,2 μ Mol. de CO₂ ; la différence est grande mais il est possible que, en présence de la suspension concentrée de « resting-cells », l'acide glutamique ait été partiellement utilisé dans une autre voie. Pour obtenir des résultats précis, il eut fallu préparer un extrait bactérien acellulaire mais, malgré les essais tentés, nous n'avons pu obtenir de résultats satisfaisants.

La décarboxylation ne semble donc pas, en ce qui concerne les amino-acides, jouer un grand rôle chez *Ps. cattleyaecolor* ; seul l'acide glutamique est susceptible d'être dégradé par cette voie.

(*) Bien que l'oxygène ne gêne pas l'action des décarboxylases, nous avons été cependant obligé de travailler sous atmosphère inerte, car l'absorption d'oxygène due à la respiration des bactéries perturbait les variations de volume des manomètres. Sous azote pur (sans O₂) au contraire, seul le dégagement de CO₂ est observé.

4. — La transamination.

Le premier, NEEDHAM signalait [1930 - 150] que dans le muscle de pigeon, les acides aspartique et glutamique peuvent être transformés en diacides non azotés sans formation d'ammoniaque et sans variation de la teneur des préparations en azote aminé total. D'autres auteurs (COHEN, BRAUNSTEIN) démontrèrent ensuite l'existence d'un système enzymatique déterminant le transfert du groupe aminé d'un amino-acide sur un α -cétoacide (transamination). Les premiers travaux portèrent surtout sur des organismes animaux [38 - 39]. En ce qui concerne les bactéries, nous citerons les recherches effectuées par EULER et coll. [54] mais il a largement été démontré depuis [LICHSTEIN et COHEN - 112 ; FELDMANN et GUNSALUS - 59, entre autres] que la transamination est chez ces organismes une réaction au moins aussi largement répandue que dans le monde animal et végétal, et que le phosphate de pyridoxal est là aussi le coenzyme nécessaire à l'activité diastasique [113].

Cette réaction de transamination s'effectue entre un α -cétoacide et un amino-acide (ou l'amide dérivée de certains d'entre eux, telles que asparagine ou glutamine) [137]. Les acides aminés les plus communément impliqués dans cette réaction sont les acides glutamique et aspartique et l' α -alanine.

La réaction peut être représentée de la manière suivante :



Au cours de ce processus on peut caractériser l'un des 2 produits du second membre de la réaction. C'est ainsi que l'amino-acide formé peut être identifié par chromatographie [FELDMANN - 59 ; TULPULÉ - 197] ou dosé en mesurant le dégagement de CO_2 produit sous l'action de décarboxylases spécifiques [GALE - 66 - 67] ou d'agents chimiques [COHEN - 39 ; EDSON - 48].

Quant aux céto-acides, ils peuvent être déterminés par chromatographie (dinitrophénylhydrazones) [TULPULÉ - 196], spectrophotométrie [AWAPARA - 12 ; CAMMARATA - 30 ; NISONOFF - 157], ou par des méthodes chimiques et enzymatiques [KREBS - 96 ; TARHAZY - 191].

En ce qui concerne *Ps. cattleya* color, nous nous sommes borné à identifier par chromatographie sur papier en adoptant la technique ascendante, les amino-acides formés dans les milieux d'étude. Nous avons effectué dans tous les cas la chromatographie des céto-acides sous formes de leurs 2 - 4 dinitrophénylhydrazones. Nos expériences ont été réalisées en tampon phosphatique de pH = 8 avec des solutions 0,2 M d'acide aminé et cétonique (sauf pour la tyrosine dont la solubilité est très faible). Les corps bactériens provenaient d'une culture de 19 heures sur gélose peptone. Les solutions étaient réparties en tubes de la manière suivante :

- 0,3 ml de solution 0,2 M amino-acide ajustée à pH = 8 - 8,2,
- 0,3 ml — — céto-acide — —
- 1,4 ml de suspension bactérienne à 25 mg N/ml (soit 35 mg N bactérien).

Ces séries de tubes étaient abandonnées pendant 2, 8 et 24 heures à l'étuve à 25° C. La réaction était alors stoppée par adjonction d'une égale quantité d'éthanol à 95°. Après centrifugation le surnageant était utilisé directement pour effectuer des chromatogrammes qui étaient révélés par la ninhydrine. Il a été réalisé concurremment des témoins contenant l'acide aminé ou l'acide cétonique seul pour vérifier l'éventuelle apparition de nouveaux acides par une voie différente de la transamination. Dans ces témoins, nous n'avons pu identifier aucun amino-acide nouveau, sauf en ce qui concerne l'histidine.

Les amino-acides utilisés étaient :

glycine
 α -alanine
acide aspartique
acide glutamique
arginine
cystéine
tyrosine
tryptophane
histidine
asparagine.

Et les céto-acides étaient :

acide pyruvique
acide α -cétoglutarique.

La chromatographie nous a permis d'observer la formation :

1. — d' α -alanine avec les systèmes :

a - Ac. glutamique + ac. pyruvique $\longrightarrow$ alanine + ac. α -cétoglutarique.

b - Asparagine + ac. pyruvique $\longrightarrow$ alanine + (amide de l'acide oxalo-acétique ?)

Cette réaction est observable après 8 heures de contact. On obtient de plus ici un léger spot d'acide aspartique. Ceci s'explique très bien grâce à la présence chez *Ps. cattleyaecolor* d'une asparaginase hydrolysant l'asparagine en acide aspartique + ammoniacque.

c - Ac. aspartique + ac. pyruvique $\longrightarrow$ alanine + ac. oxalo-acétique
(Cette réaction est faible, même après 24 heures.)

2. — D'acide glutamique dans les tubes contenant :

a - Alanine + ac. α -cétoglutarique $\longrightarrow$ ac. glutamique + ac. pyruvique.
(Production rapide, importante à la 8^e heure.)

b - Asparagine + ac. α -cétoglutarique $\longrightarrow$ ac. glutamique + amide de l'acide oxaloacétique ?

Là, nous avons retrouvé également un spot d'acide aspartique, conséquence de l'action de l'asparaginase du germe.

c - Ac. aspartique + ac. α -cétoglutarique $\longrightarrow$ ac. glutamique + ac. oxaloacétique.
(Réaction lente et faible.)

Au cours de ces essais nous avons en outre pu faire les deux constatations suivantes :

1. — Avec la cystéine on obtiendrait une production faible et inconstante d'alanine quand le céto-acide est l'acide pyruvique et d'acide glutamique en présence d'acide α -cétoglutarique.

2. — On noterait la présence tardive et constante d'acide glutamique dans les milieux à base d'histidine, quelque soit le céto-acide présent. Mais comme cet acide apparaît aussi dans le témoin contenant l'histidine seule, il

est la conséquence probable de l'ouverture du cycle imidazolique qui le libère comme nous l'avons déjà vu (p. 72).

De ces derniers essais, il résulte que *Ps. cattleyaecolor* est capable de transamination et ce type de réaction joue vraisemblablement un rôle important dans le métabolisme de ce germe. On remarque que seuls 3 amino-acides (et une amide en dérivant) sont utilisés pour réaliser ces réactions : alanine et acide glutamique (surtout), asparagine et acide aspartique. On les retrouve soit dans la partie gauche, soit dans le membre de droite de ces réactions. Ceci prouve leur réversibilité. Remarquons aussi la possibilité de transfert du groupement aminé de l'asparagine ce qui explique, en partie du moins, l'excellente croissance de *Ps. cattleyaecolor* sur le milieu L_1 mis au point par Ph. LASSEUR dans l'étude des germes chromogènes, et où ce corps constitue la seule source d'azote.

II. — UTILISATION D'AUTRES SOURCES D'AZOTE

Si l'azote minéral et les différents amino-acides constituent les principales sources d'azote utilisables par les bactéries, il est aussi d'autres corps pouvant à l'occasion jouer ce rôle, tels l'asparagine, la glutamine, et l'urée qui, introduits dans un milieu L_1 où la source de carbone est constituée par la glycérine, permettent une bonne croissance et une manifestation correcte de la chromogénèse.

Dans de tels milieux ensemencés avec *Ps. cattleyaecolor* et après 10 jours de culture à 25° C, il est possible par chromatographie de caractériser les acides aminés suivants :

TABLEAU XVIII

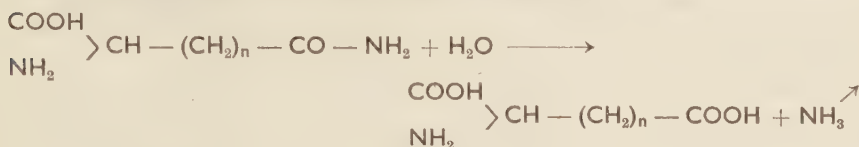
ACIDES AMINÉS RETROUVÉS DANS LES MILIEUX DE CULTURE DE *PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR* EN PRÉSENCE D'ASPARAGINE ET D'URÉE

Source d'azote contenu dans le milieu	Acides aminés retrouvés dans ce milieu
UREE	α -alanine, acide glutamique, arginine (faible)
ASPARAGINE	α -alanine glycine acide glutamique et aspartique histidine (faible)

Ceci conduit à considérer qu'il existe chez ce microorganisme des enzymes spécifiques assurant le métabolisme de ces sources : uréase et asparaginase (ou glutaminase). Remarquons toutefois qu'en ce qui concerne l'asparagine et la glutamine, il peut aussi se produire à leurs dépens des réactions de transamination assurant l'élaboration de nouveaux amino-acides.

I. — Asparaginase et glutaminase.

Ce type d'enzyme assure la décomposition par hydrolyse de 2 amides et donne les acides correspondants (aspartique ou glutamique) et de l'ammoniaque comme on le voit dans la formule suivante :



n = 1, asparagine et acide aspartique.

— 2, glutamine et acide glutamique.

Ces enzymes se trouvent dans certains organes d'animaux (foie, rein, cerveau) [ERRERA - 52 - 53] et également chez la levure [GRASSMAN - 75], le colibacille [RUDMAN - 173], les Clostridies [HORN - 80].

On peut aisément caractériser ces enzymes par dosage de l'ammoniaque dégagée en présence d'un substrat adéquat. Ils sont remarquablement spécifiques de celui-ci à un point tel que seul un isomère (L) est attaqué, l'énantiomorphe l'étant très faiblement (1 à 3 %).

Le mode opératoire que nous avons employé pour effectuer ces caractérisations, chez *Ps. cattleyaecolor* est celui préconisé par MEISTER [136].

On met à incuber dans des tubes bouchés :

- 0,5 ml de L-asparagine 0,04 M (solution à 0,652 % du monohydrate commercial) soit 20 μ Mol.
- 0,5 ml d'une suspension bactérienne non proliférante à 10 mg N/ml (culture sur L₁ gélosé, âgée de 24 heures.)
- 0,5 ml d'arsénite K 0,02 M ; ce sel a pour but d'inhiber la désamination ultérieure de l'acide aspartique formé, ce qui fausserait les résultats du dosage de l'ammoniaque. L'arsénite n'a aucune action inhibitrice sur l'hydrolyse enzymatique de l'asparagine. La réaction est arrêtée après 1, 2, 3 heures par adjonction de 0,5 ml d'acide trichloracétique à 10 %.

La disparition de l'asparagine qui est appréciée chromatographiquement (elle donne en effet, sous l'action de la ninhydrine, un spot jaunâtre de R_f = 0,19 en butanol acétique) est complète, dans les conditions de l'expérience, au bout de 3 heures, tandis qu'est présent le spot violacé de l'acide aspartique (R_f = 0,24).

L'ammoniaque est dosée acidimétriquement après déplacement soit à chaud (FOREMAN), soit à froid (CONWAY).

D'autre part, pour vérifier l'influence du pH, nous avons conduit une autre expérience identique à la première, à cela près que le tampon était un tampon phosphaté de pH = 6.

Les résultats obtenus en défalquant l'ammoniaque endogène sont groupés dans le tableau XIX.

La lecture des chiffres obtenus au bout de 3 heures montre qu'il y a, à pH convenable, stoechiométrie entre l'asparagine disparue et l'ammoniaque dégagée. L'influence du pH est aussi nettement démontrée.

TABLEAU XIX

**LIBÉRATION D'AMMONIAQUE SOUS L'ACTION
DE L'ASPARAGINASE DE PSEUDOMONAS CATTLEYAEOLOR
ET INFLUENCE DU pH SUR CET ENZYME**

μ Mol. libérées de NH_3 à partir de 20 μ Mol. d'asparagine				
Temps	1 h.	2 h.	3 h.	Méthodes de dosage
pH = 8,5	2,3	8,4	19,7	FOREMAN
	2,1	8,3	19,2	CONWAY
pH = 6	1,7	2,6	7,4	FOREMAN
	1,7	2,4	7,1	CONWAY

De la même manière, nous avons pu mettre en évidence une activité glutaminasique mais bien plus faible (3,2 μ Mol. NH_3 libérées après 3 heures de contact en tampon acétate de pH = 5 et 2,7 μ Mol. en tampon borate de pH = 8,5).

On peut donc conclure que si le seul mode possible d'utilisation de la glutamine par *Ps. cattleyaeolor* est la transamination (et peut-être aussi la désamination), l'asparagine peut en plus être métabolisée grâce à l'asparaginase. L'acide aspartique alors formé peut à son tour évoluer suivant les diverses voies déjà exposées. Il est de fait d'ailleurs que la croissance se manifeste plus vite en présence d'asparagine que de glutamine.

2. — Uréase.

Cet enzyme à l'étude et à l'obtention duquel reste attaché le nom de SUMNER (1925), hydrolyse l'urée pour donner de l'acide carbonique et de l'ammoniaque. D'abord mise en évidence dans le règne végétal (fève Jack), l'uréase existe aussi chez les bactéries et peut même servir de test de différenciation d'espèce [*Pseudomonas* ; BRISOU - 26].

On la caractérise simplement par dosage de l'ammoniaque libéré par hydrolyse de l'urée. Dans une série de tubes, (lavés au mélange sulfo-chromique et à l'eau régale, pour enlever les traces de métaux lourds présents qui inhiberaient fortement l'enzyme) on répartit :

- 1 ml de suspension bactérienne non proliférante (10 mg N total) dans un tampon phosphate 0,066 M, pH = 7. Les bactéries proviennent d'une culture de 18 heures sur gélose peptonée à laquelle on a ajouté 0,5 % d'urée.
- 0,2 ml urée 0,1 M (soit 20 μ Mol.).
- 0,8 ml tampon phosphate pH = 7.

On abandonne à 28° C pendant un temps variable (de 30 minutes à 4 heures). La réaction est arrêtée par adjonction de 1 ml de HCl N. On centrifuge alors et dans 0,3 ml de liquide surnageant on ajoute successivement 7 ml d'eau puis 1 ml de réactif de NESSLER et complète à 10 ml par q. s. d'eau. On lit ensuite au photomètre à 5.200 Å. On mesure de la même manière l'ammoniaque réduite, dans le même temps, par la suspension bactérienne seule sans urée.

Les résultats obtenus sont exprimés dans une courbe (fig. 6) où sont portées en ordonnée les quantités d'ammoniaque libérées en fonction du temps (abscisse).

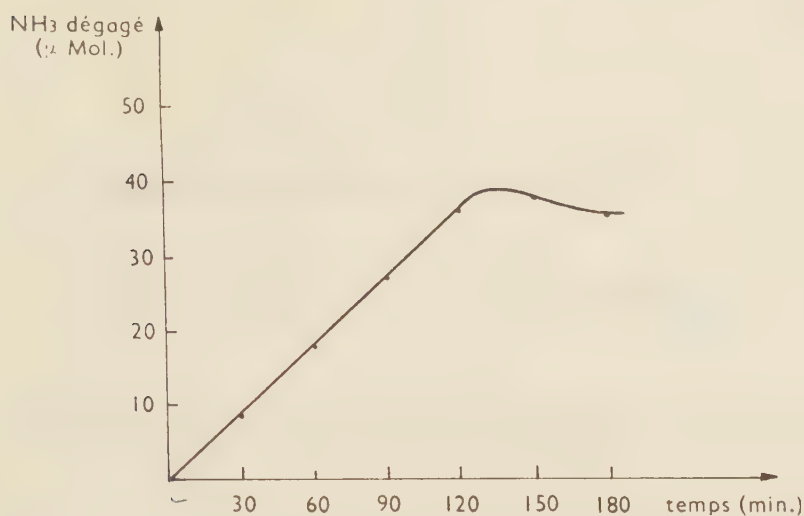


Fig. 6. — Hydrolyse de l'urée
par *Pseudomonas Cattlejaecolor* en fonction du temps

De ces essais il résulte que *Ps. cattlejaecolor* possède une uréase active qui lui permet d'utiliser l'ammoniaque libérée pour sa croissance et ceci en présence d'une source de carbone convenable. Nous noterons cependant qu'il ne peut utiliser l'urée comme seule source d'azote et de carbone.

PARTIE II

ASPECTS DU MÉTABOLISME CARBONE

DE

PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR

I. — CROISSANCE DE PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR EN PRÉSENCE D'ACIDES ORGANIQUES

Pour étudier la croissance de *Ps. cattleyaecolor* nous avons utilisé le biophotomètre enregistreur de BONNET-MAURY.

Nous avons utilisé le milieu de base M.B. dans lequel on ajoute la source d'azote (0,5 % NH_4NO_3) et de carbone, cette dernière constituée par l'acide organique à la concentration finale de 1 %. Le tout est ajusté à $\text{pH} = 6,8$ et stérilisé par filtration sur bougie L_3 . Les bactéries proviennent d'une culture sur gélose âgée de 16 heures.

Chaque cuve du biophotomètre reçoit :

— 7,5 ml de milieu +

— 0,5 ml de suspension bactérienne

et l'on fait un seul témoin recevant le milieu de base et la source d'azote seuls.

Les acides aminés utilisés ont été :

acétate

α -cétoglutarate

citrate

fumarate

lactate

malate

pyruvate

succinate

L'étude des courbes obtenues (fig. 7 et 8) permet de classer ces acides par ordre décroissant d'utilisation par *Ps. cattleyaecolor* de la manière suivante :

Succinate - pyruvate, lactate, fumarate - malate

et beaucoup moins :

Citrate et α -cétoglutarate.

L'acétate n'est pratiquement pas utilisé.

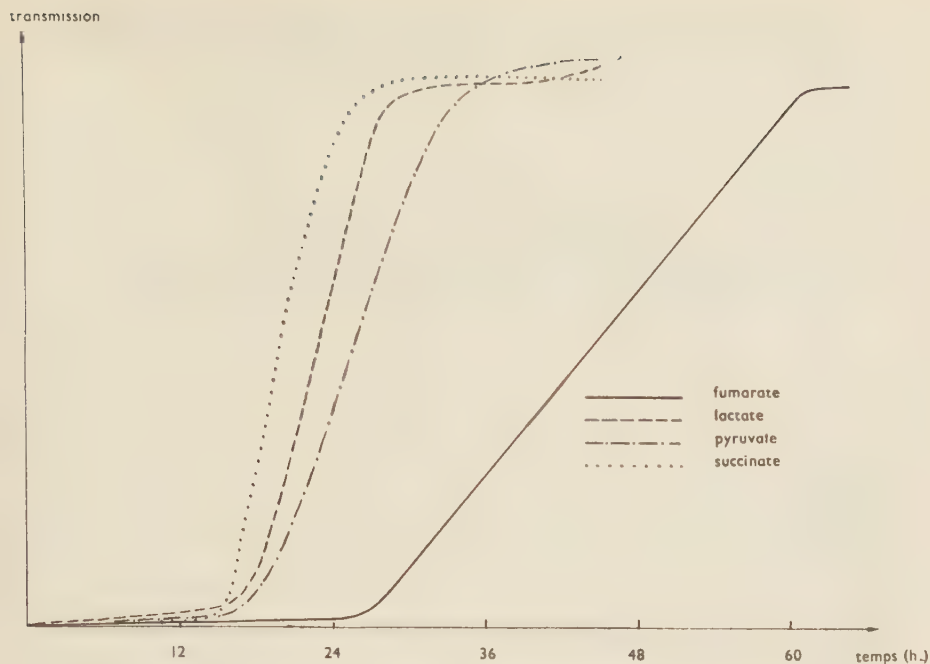


Fig. 7. — Influence de divers acides organiques sur la croissance de *Pseudomonas Cattlejaecolor*

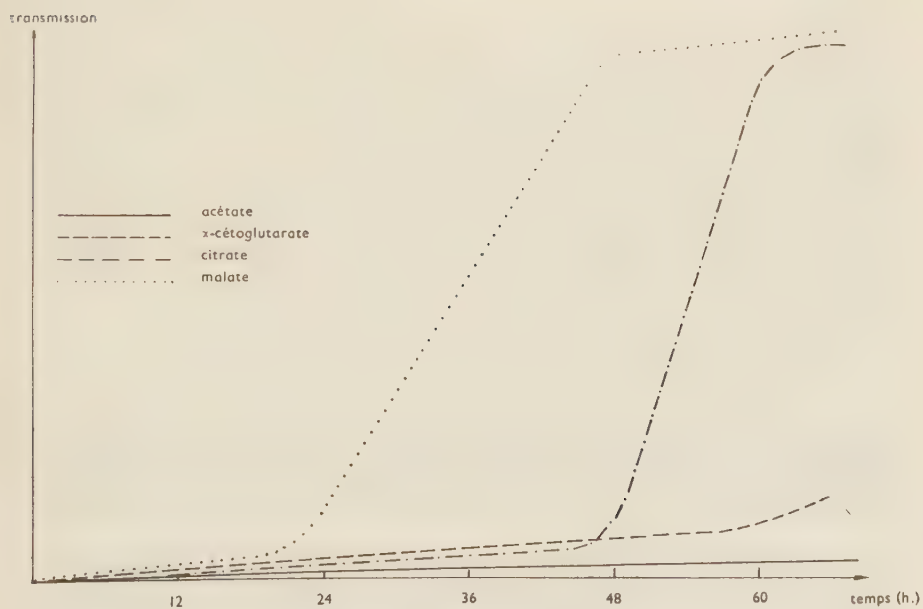


Fig. 8. — Influence de divers acides organiques sur la croissance de *Pseudomonas Cattlejaecolor*

D'ailleurs la mesure des pH des milieux à la fin des expériences montre une alcalinisation de ceux-ci. Elle est en général, corrélative à l'intensité de la croissance, comme nous le voyons dans le tableau suivant :

TABLEAU XX

**VARIATION DU pH DE MILIEUX
OU PSEUDOMONAS CATTLEAECOLOR EST CULTIVÉ
EN PRÉSENCE DE DIVERS ACIDES ORGANIQUES**

Acides	pH initial	pH final
Succinique	6,8	8,6
Fumarique	6,9	8,4
Pyruvique	6,8	8,2
Lactique	6,8	8,2
Malique	6,9	8
α -cétoglutarique	6,9	7,4
Citrique	6,9	6,9
Acétique	6,8	6,7
Témoin	6,9	7,1

L'étude comparative des courbes de croissance et des variations du pH dans les milieux où a eu lieu celle-ci permet d'affirmer que cette alcalinisation des milieux est en corrélation étroite avec l'intensité d'utilisation des acides (existants dans le milieu sous forme de leur sel Na). Il y a libération de Na^+ .

Croissance en présence de 2 acides.

Ps. cattleyaecolor peut utiliser pour sa croissance des sources d'azote constituées par des sucres et certains produits du métabolisme biologique normal de ceux-ci : glycérine, acides organiques. Parmi ces derniers on reconnaît l'importance de l'acide pyruvique qui constitue la « plaque tournante » du catabolisme chez les organismes vivants.

Il nous a donc paru intéressant d'ajouter cet acide, en quantités croissantes, à une série de milieux contenant déjà soit un acide qui est métabolisable (succinate) soit au contraire peu utilisé (acétate, citrate) et de mesurer les variations possibles de l'intensité de la croissance.

A cet effet nous avons réalisé les systèmes suivants :

Chaque série de fioles est ainsi composée de :

N° des systèmes	Milieu Base + R-COOH 1 %	Pyruvate stérile 20 %	Suspension	Concentration finale en pyruvate (%)
1	7,5 ml	0 (témoin)	0,5	0
2	7,4	0,1	»	0,25
3	7,3	0,2	»	0,50
4	7,2	0,3	»	0,75
5	7,1	0,4	»	1
6	7	0,5	»	1,25

Nous avons alors pu constater que :

1. — L'adjonction de pyruvate n'a aucune influence sur la croissance en milieu contenant du succinate.

2. — En milieu malate, on n'observe aucune action favorisante, mais plutôt un léger effet inhibiteur.

3. — Avec le citrate, il y a action favorisante dont l'optimum se manifeste pour 0,75 % de pyruvate.

4. — Avec l'acétate on observe des faits identiques à ceux obtenus avec le citrate, mais l'effet est plus discret.

Inversement, nous avons aussi étudié les modifications que pourraient apporter l'acétate (non utilisable par *Ps. cattleyaecolor*) ajouté, en quantités croissantes, à d'autres acides organiques dans des conditions expérimentales identiques. Nous avons pu constater qu'en règle générale, l'acétate n'exerçait aucune action favorisante sur la croissance de *Ps. cattleyaecolor* en présence d'un autre acide organique (citrate, succinate, malate).

II. — RESPIRATION DE *PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR* EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS ACIDES ORGANIQUES

L'étude du métabolisme oxydatif des microorganismes et de leur respiration a été l'objet de très nombreux travaux. La preuve de l'existence chez ces organismes d'un cycle, type cycle tricarboxylique, ne peut être apportée que si le germe envisagé est capable d'utiliser pour sa croissance les substances impliquées dans ce cycle.

La présence d'un cycle respiratoire terminal chez les bactéries est loin d'avoir fait l'unanimité chez les chercheurs. Il faut remarquer [AJL - 6] que si quelques bactéries seulement attaquent les acides di- et tri-carboxyliques, cela ne signifie pas forcément qu'il n'existe pas chez les autres des enzymes conditionnant cette utilisation. La perméabilité des membranes joue en effet

un rôle important dans le métabolisme des bactéries, et si parfois les « resting-cells » ne montrent aucun pouvoir d'attaque, il peut en être différemment en opérant avec des extraits acellulaires d'une même bactérie. Malgré leur existence chez la plupart des êtres vivants, les cycles de SZENT-GYÖRGYI et de KREBS [98] ne sont pas seuls représentatifs de la respiration cellulaire. KREBS lui-même [98] admettait déjà l'existence de 2 cycles différents assurant l'utilisation de l'acétate par la levure, l'un permettant la croissance, l'autre assurant l'énergie nécessaire aux métabolismes.

Chez une espèce bactérienne, il est possible de mettre en évidence l'existence simultanée de plusieurs cycles [LICHSTEIN - 111]. Leur nature et les types de réactions qu'ils impliquent sont encore l'objet de controverses.

I. — Conditions normales.

La technique manométrique est un procédé classique d'étude de l'oxydation des acides di- et tri-carboxyliques par de nombreux germes. Chez *Pseudomonas*, certaines espèces utilisent pour assurer leur métabolisme un cycle semblable à celui de KREBS, comme l'ont montré BARRETT pour *Ps. fluorescens* [15], CAMPBELL pour *Ps. aeruginosa* [31 - 32] et ROBINSON pour *Ps. nigrificans* [172]. Des enzymes variés impliqués dans ce cycle ont été aussi détectés par ces auteurs [32 - 172].

En étudiant le pouvoir d'utilisation de ces acides par *Ps. cattleyaecolor* on est conduit à penser qu'il en est de même, mais cette espèce n'utilise pas l'acétate. Nous avons mis le fait en évidence en effectuant l'étude manométrique de la respiration de ce germe en présence de différents acides organiques du cycle de KREBS.

Nous avons adopté le protocole suivant :

a. — Matériel expérimental :

Il est constitué par une solution de tampon phosphate 0,066 M, pH = 7, une solution 0,1 M d'acide organique (ajustée à pH = 7 par NaHCO_3 , puis stérilisée).

Une suspension de cellules non proliférantes obtenues à partir d'une culture de 24 heures sur milieu de base + 0,5 % NH_4NO_3 + 2 % glycérine + 3 % gélose, était recueillie, lavée et mise en suspension dans un tampon phosphatique.

b. — Expériences :

Durée de 3 heures. Température : 28° C. Auparavant on réalisait l'équilibre de température dans les fioles par contact de 15 minutes avant de mélanger.

Ces fioles étaient préparées en répartissant :

- 0,2 ml KOH 10 % dans la cupule centrale
- 2,8 ml de suspension bactérienne dans l'espace annulaire (30 mg N bactérien par fiole)
- 0,2 ml de solution 0,1 M d'acide dans le diverticule latéral (20 μ Mol.)

Un témoin de la respiration endogène, sans substrat, était aussi réalisé.

c. — **Les résultats** obtenus ont été rassemblés dans le tableau suivant (XXI) où sont exprimées (en μ Mol.) les quantités de O_2 consommées (les valeurs de l'endogène étant défalquées).

TABEAU XXI

**CONSUMMATION D'OXYGÈNE (en μ Mol.) AU COURS DU TEMPS
PAR PSEUDOMONAS CATTLEAECOLOR
EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS ACIDES ORGANIQUES**

Acides	Consommation de O_2 (μ Mol.)						Consommation totale en 3 heures
	$\frac{1}{2}$ h.	1 h.	1 h. 30	2 h.	2 h. 30	3 h.	
Acétique	3,4	10,6	16,3	19,5	19,5	19,5	19,5
α -cétoglutarique .	2	5,5	9,1	12,6	15	16,3	16,3
Citrique	1	2,5	3,5	5,1	6,5	7,4	7,4
Fumarique.....	5,5	11,9	18,4	24	29,9	35,7	35,7
Lactique	3,8	6,6	9,3	11,9	14,9	17,8	17,8
Malique	2,2	4,5	8,2	11,2	13,5	16,4	16,4
Pyruvique	7	14,4	22,6	27,2	27,8	28,9	28,9
Succinique	4,8	9,8	14,4	20,4	29,3	29	29
Glucose	10,5	22,7	35,2	46	54,4	62,8	62,8

A. — Avec α -cétoglutarate, citrate, fumarate, lactate, malate et succinate, l'oxydation est régulière (la courbe de consommation de O_2 en fonction du temps est sensiblement une droite) ; il n'y a pas d'accumulation de métabolite non utilisable déplaçant l'équilibre et empêchant la poursuite normale de la réaction d'oxydation.

B. — Avec acétate, pyruvate (et, à moindre degré, glucose) par contre il y a un infléchissement brutal de la courbe au bout d'un certain temps traduisant :

- 1 - soit un épuisement du substrat (cas possible de l'acétate),
- 2 - soit la formation et l'accumulation d'un produit de réaction non ou lentement attaqué par la bactérie et qui freine alors plus ou moins la marche du processus oxydatif,
- 3 - soit l'existence simultanée ou non à l'oxydation d'un autre type de réaction (décarboxylation, hydrolyse, etc...) s'effectuant dans les conditions expérimentales où l'on se trouve.

Pour préciser ces hypothèses, nous avons été amené à rechercher les acides organiques présents dans les milieux utilisés (acides fixes, volatils, et

cétoniques) en adoptant la méthode chromatographique. A cet effet, les acides présents étaient concentrés par évaporation des solutions puis nous avons procédé à l'extraction des résidus par l'éther. Les acides volatils par contre ont été directement recherchés dans les solutions brutes. Les acides identifiés sont rassemblés dans le tableau XXII.

TABLEAU XXII

**ACIDES ÉLABORÉS PAR DES CELLULES NON PROLIFÉRANTES
DE PSEUDOMONAS CATTLEYAEOLOR
EN PRÉSENCE D'UN SEUL ACIDE ORGANIQUE**

Acide initial	Acides élaborés identifiés
Acétate	Pyruvate, acétate.
α -cétooglutarate	α -cétooglutarate, succinate, malate.
Citrate	Citrate, α -cétooglutarate, succinate.
Fumarate	Malate, pyruvate.
Lactate.....	Lactate, pyruvate, acétate (faible).
Malate	Malate, pyruvate, oxalacétate, acétate (faible).
Pyruvate	Pyruvate, acétate (faible), succinate (?).
Succinate	Malate, pyruvate.

Ces investigations nous ont conduit à tirer les conclusions suivantes :

1. — **Avec l'acétate** : Le seul acide retrouvé est l'acide pyruvique et ceci en très faible quantité. Nous ignorons le mode d'attaque de l'acétate (la seule chose que l'on puisse avancer est la formation de l'acide pyruvique par voie phosphorylante avec passage intermédiaire par le stade acétylphosphate).

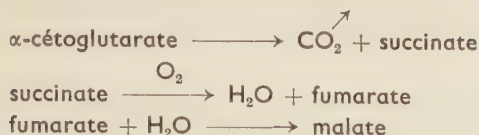
2. — **Avec l' α -cétooglutarate** : Nous avons retrouvé les acides α -cétooglutarique, succinique et malique.

Ceci suppose une attaque lente de l' α -cétooglutarate par décarboxylation : le pH optimum d'action des décarboxylases se trouve aux alentours de 4 à 5 ; or nous sommes ici à pH = 7.

Ceci nous a amené à rechercher l'action décarboxylasique de *Ps. cattleyaeolor* sur l'acide α -cétooglutarique. Pour ce faire, nous avons simplement, dans les expériences, remplacé le tampon phosphate par un tampon acétate 0,1 M de pH = 4,5 (identique à celui déjà utilisé pour l'étude de la décarboxylation de l'acide glutamique). A ce pH, CO_2 libéré ne forme pratiquement pas de bicarbonate et l'on peut facilement mesurer le dégagement de CO_2 .

Nous avons ainsi vérifié qu'il y avait décarboxylation stoechiométrique de cet acide.

La chaîne des réactions s'établit comme suit :

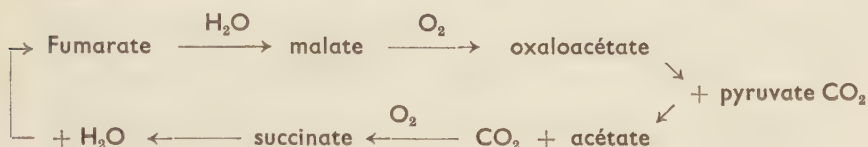


Le fait que l'on n'ait pu retrouver le fumarate s'explique par la présence, chez *Ps. cattleyaecolor*, d'une fumarase très active transformant très vite cet acide en malate.

3. — **Avec le citrate** : Les acides retrouvés ont été les suivants : citrique, α -cétoglutarique et succinique (faible).

La formation d' α -cétoglutarate s'explique très bien par oxydation et décarboxylation du citrate, après transposition intermédiaire en isocitrate. Il ne nous a pas été possible cependant d'identifier le spot de l'acide isocitrique, la valeur de son Rf étant très proche de celle de l'acide citrique. Les deux spots doivent être confondus.

4. — **Avec le fumarate** : nous avons identifié les acides malique et pyruvique. Le résultat est en concordance avec le cycle classique de SZENT-GYÖRGYI :



L'acide fumarique a dû être totalement transformé en acide malique car nous n'avons pu le retrouver par chromatographie : ce qui suppose la présence chez *Ps. cattleyaecolor* d'une fumarase très active. Il est d'ailleurs simple et facile de suivre l'action de cet enzyme en adoptant la technique mise au point par RACKER [170]. L'acide fumarique possède en effet un maximum d'absorption dans l'U.V. vers 2.400 Å. alors que l'absorption de l'acide malique est comparativement faible à cette longueur d'onde. L'action de l'enzyme peut donc être suivie par la diminution de la densité optique en fonction du temps, objectivant la disparition de l'acide fumarique.

Nous avons opéré de la manière suivante :

Dans une série de tubes (10 tubes), on mélange et met à incuber à 28° C :

- 1 ml suspension bactérienne (tampon phosphate 0,066 M, pH = 7) à 10 mg N/ml.
- 1 ml solution 0,01 M acide fumarique (neutralisée par la quantité théorique de NaHCO₃).
- 0,5 ml tampon phosphatique 0,066 M, pH = 7.

Les lectures étaient faites au spectrophotomètre à 2.400 Å, en cuve de quartz de 1 cm, toutes les minutes, après avoir au préalable inactivé l'enzyme par 0,5 ml d'acide trichloracétique à 10 %. Après centrifugation pour éliminer les corps bactériens, le surnageant était convenablement dilué (1 μ Mol. acide fumarique à une D.O. d'environ 0,325).

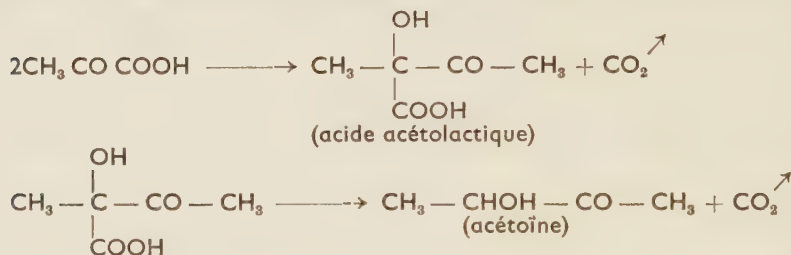
La courbe est une droite, du moins dans le temps de l'expérience. L'intensité d'hydratation est d'environ 0,9 μ Mol./minute.

5. — **Avec le lactate** : les acides retrouvés sont les acides lactique, pyruvique et un peu d'acide acétique, d'autre part, la réaction de WESTERFELD caractéristique de l'acétoïne, s'est montrée positive. Il y a donc déshydrogénation normale de l'acide lactique en acide pyruvique.

6. — **Avec le malate** : les acides retrouvés sont : malique, oxaloacétique (traces), pyruvique, acétique (faible). Le malate est oxydé en oxaloacétate qui est décomposé (par décarboxylation enzymatique et aussi simplement par contact avec l'oxygène atmosphérique) en pyruvate.

7. — **Avec le pyruvate** : les acides retrouvés sont : pyruvique, acétate (faible), succinate (douteux). Comme dans le cas de l' α -cétoglutarate, il y a là aussi indiscutablement décarboxylation de l'acide pyruvique avec transformation en acide acétique, ceci représentant le premier type de réaction.

Mais cette réaction n'est pas la seule à invoquer car, simultanément, il se produit entre 2 molécules d'acide pyruvique une réaction de décarboxylation plus complexe avec production finale d'acétoïne (acétylméthylcarbinol) et dont la formation peut être représentée [JUNI - 86] de la manière suivante :



Nous avons très nettement caractérisé l'acétoïne dans nos expériences.

Ceci explique également la présence de ce corps dans les milieux contenant l'acide lactique car le premier terme de transformation de celui-ci est justement l'acide pyruvique.

La comparaison entre le spot de l'acide acétique obtenu et l'intensité de la réaction de caractérisation de l'acétoïne (compte tenu des volumes utilisés dans chaque cas) montre que le second type de réaction est prépondérant.

8. — **Succinate** : Acides retrouvés : malique, pyruvique (faible).

Il y a dans ce cas transformation normale en malate, avec passage probable par le stade fumarate, qu'on ne peut caractériser, en raison de l'activité fumarasique intense du germe.

2. — Action d'inhibiteurs sur la respiration de *Pseudomonas cattleyae*-color.

Ces inhibiteurs agissent en bloquant certaines réactions d'oxydation à un stade déterminé du cycle oxydatif, soit par compétition avec le substrat (malonate) soit par combinaison avec tout ou partie de l'enzyme (KCN , CH_2ICOO^-) qu'ils inactivent. Ils permettent de ce fait l'étude indirecte de ce cycle.

C'est pourquoi, après avoir étudié le métabolisme oxydatif de ce germe, nous avons recherché l'action de quelques-uns de ces inhibiteurs (malonate, fluorure et KCN) sur son métabolisme.

L'action du malonate sur les oxydations biologiques fut d'abord étudiée par THUNBERG puis reprise par QUASTEL et ses collaborateurs [167 - 169] qui constatèrent la spécificité de son action sur la succinodéshydrogénase. Cet acide permit aussi à SZENT-GYÖRGYI d'établir l'importance des acides en C_4

dans les oxydations biologiques [188]. Enfin, KREBS et EGGLESTON [97] démontrèrent la nature compétitive de cette inhibition et l'importance pour celle-ci non seulement de la concentration en malonate mais encore du rapport malonate/succinate ; ils virent aussi que l'acide fumarique peut lever l'inhibition observée.

Le fluorure a une action tout autre. Son effet inhibiteur fut tout d'abord remarqué à l'égard du sang, dans lequel il empêchait la glycolyse [EFFRONT, 1890 - 49]. LIPMAN [114] montra que cette inhibition est due à la formation d'un complexe avec le fer, d'un genre semblable à celui de la fluorométhémoglobine. MEYERHOF et LOHMAN [139] virent que l'enzyme de la glycolyse le plus sensible à l'action du fluorure est l'énolase. BOREI [21] a considéré que l'inhibition s'exerçait avec le fluorure :

- dans la fermentation (anaérobie), il agirait sur l'énolase
- dans la respiration, ou dans la chaîne d'oxydation, il bloquerait par complexation du fer l'action de transporteur de type cytochromique.

L'action du cyanure enfin se porte surtout sur la cytochrome-oxydase (cyt. a_3) dont il complexe le fer : bloquant ainsi toute la chaîne d'oxydations cellulaires. Cependant on a remarqué [BATELLI et STERN - 16 ; DIXON - 45] que la respiration de certaines cellules n'est que partiellement inhibée par le cyanure ce qui suppose l'existence d'au moins 2 systèmes respiratoires dont l'un serait insensible à cet inhibiteur.

Protocole expérimental :

Dans les fioles de WARBURG on répartit :

- a - Dans la cupule centrale :
 - 0,2 ml potasse 10 %
- b - Dans l'espace annulaire :
 - 0,3 ml de solution à concentration convenable d'inhibiteur
 - 2,4 ml de suspension bactérienne en tampon phosphatique (pH = 7) de *Ps. cattleyaecolor* (30 mg azote bactérien).
- c - Dans le diverticule latéral :
 - 0,3 ml de solution 0,2 M de substrat (des expériences préliminaires nous ayant montré que cette concentration provoque une consommation maxima d'oxygène par les suspensions non proliférantes de *Ps. cattleyaecolor*).

On laissait en repos 15 minutes avant de mélanger.

Durée des expériences : 3 heures. Température : 28° C.

Les substrats utilisés furent :

glucose
pyruvate
succinate
malate

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux XXIII (malonate), XXIV (fluorure) et XXV (cyanure).

En ce qui concerne le cyanure, plusieurs précautions expérimentales ont été prises : préparation extemporanée des solutions, adjonction de KCN à la solution de potasse des cupules centrales des fioles, en raison de la volatilité de l'ion CN^- .

TABLEAU XXIII

**INHIBITION PAR LE MALONATE
DE L'OXYDATION DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS CARBONÉS
PAR PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR**

Substrat	Glucose			Pyruvate			Succinate			Malate		
Consommation O ₂ (μ Mol.) Témoin sans inhibi- teur	55			37			38			18		
Rapport : $\frac{\text{Inhibiteur}}{\text{Substrat}}$	1	0,25	0,1	1	0,25	0,1	1	0,25	0,1	1	0,25	0,1
Consommation O ₂ (μ Mol.)	30	55	56	20	32	37,5	1,6	6,1	33	13	15	18
% inhibition	44	0	0	47	15	0	95,8	84	13	29	19	0

TABLEAU XXIV

**INHIBITION PAR LE FLUORURE
DE L'OXYDATION DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS CARBONÉS
PAR PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR**

Substrat	Glucose		Pyruvate		Succinate		Malate	
Consommation O ₂ (μ Mol.) Témoin sans inhibiteur	65		46,5		42		24	
Rapport : $\frac{\text{Inhibiteur}}{\text{Substrat}}$	0,5	0,16	0,5	0,16	0,5	0,16	0,5	0,16
Consommation O ₂ (μ Mol.)	12,6	38,5	11,6	38,5	15,4	38	12,5	21
% inhibition	80,6	40	75	18	63,5	9,5	48	12

TABLEAU XXV

**INHIBITION PAR LE CYANURE
DE L'OXYDATION DE DIFFÉRENTS SUBSTRATS CARBONÉS
PAR PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR**

Substrat	Glucose		Pyruvate		Succinate		Malate	
Consommation O ₂ (μ Mol.)	55,8		33		38,5		20,5	
Témoin sans inhibiteur								
Rapport : $\frac{\text{Inhibiteur}}{\text{Substrat}}$	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻³
Consommation O ₂ (μ Mol.)	7	16,2	11	22,4	3,2	8,5	2,1	6,7
% inhibition	87	71	66	32	92	78	90	69

Discussion :

Le malonate inhibe nettement l'oxydation du succinate ; les autres substrats par contre (y compris le glucose) sont beaucoup moins touchés par cet inhibiteur.

D'autre part, l'oxydation du glucose et du pyruvate est extrêmement contrariée par la présence de fluorure. *Ps. cattleyaecolor* possède donc une énalase.

Enfin, le cyanure abolit presque totalement la respiration de *Ps. cattleyaecolor*, sauf en présence de pyruvate : la dégradation de ce dernier peut donc se faire aussi par une voie insensible au cyanure où peut-être KCN réagit sur cet acide pour donner une cyanhydrine peu toxique [fait remarqué par AUBEL et coll. chez *Escherichia coli* - 11]. Mais comme le taux de la respiration endogène en présence de cyanure est bien plus fortement abaissé que celui d'utilisation du pyruvate, l'idée prévaut d'une métabolisation de ce substrat par un système enzymatique non inactivé par le cyanure.

Si donc l'utilisation de différents acides organiques par *Ps. cattleyaecolor* peut nous conduire à admettre chez ce germe l'existence d'un cycle oxydatif identique ou très semblable au cycle tricarboxylique, il faut cependant reconnaître qu'il n'est pas la seule voie catabolique utilisée comme le montre l'étude de l'action d'inhibiteurs. Le catabolisme du glucose par *Ps. cattleyaecolor* n'est que partiellement arrêté par le malonate, l'attaque du pyruvate n'est pas annihilée par le cyanure comme celle d'autres substrats. En ce qui concerne l'acide pyruvique, nous avons montré qu'il était partiellement transformé en acétoïne par une réaction de décarboxylation assez complexe ; or ce type de réaction est assez peu sensible au cyanure. Chez *Aerobacter aerogenes* (SILVERMANN et WERKMANN - [182], KCN à 5.10^{-3} diminue d'environ 40 % l'activité des enzymes assurant la formation d'acétoïne à partir de l'acide butyrique (mesurée par l'importance du dégagement de CO₂). Il est possible aussi que l'oxydation de l'acide pyruvique soit le fait d'un enzyme autooxydable à l'air (type flavine-nucléotide) sans intervention oxydative finale du système cytochromique.

III. — RECHERCHES DES DÉSHYDROGÉNASES DE PSEUDOMONAS CATTLEYAEOLOR

« L'oxydation » des substrats, objectivée par une consommation d'oxygène n'est en fait que le terme final d'une longue série de réactions de déshydrogénations (et de décarboxylations, l'oxygène étant le dernier accepteur de l'hydrogène).

Chaque substrat est donc « déshydrogéné » grâce à un enzyme spécifique et il est facile de rechercher les déshydrogénases responsables grâce à la classique méthode de THUNBERG. Nous avons dans ce but, suivi la technique préconisée par BURRIS [28].

Dans des tubes de THUNBERG nous avons réparti :

a - dans le tube :

- 0,5 ml solution bleu de méthylène à 10^{-3}
- 0,5 ml de solution substrat 0,1 M.
- 1,5 ml tampon phosphatique 0,066 M, pH = 7.

b - dans le diverticule :

- 0,5 ml suspension bactérienne (2 mg N bactérien/ml) (culture de 22 heures sur gélose, dispersée dans le tampon PO_4 de pH = 7).

On équilibre les températures (25°C), on fait le vide et on mélange.

L'intensité des activités déshydrogénasiques est appréciée par la vitesse de décoloration du bleu de méthylène (qui sert d'accepteur d'hydrogène) par rapport à celle obtenue avec le témoin endogène.

Les temps de décoloration sont compris entre 10 et 30 minutes.

Nous avons observé une activité déshydrogénasique de *Ps. cattleyaeolor* en présence de (par ordre décroissant d'intensité) :

- Glucose, mannose.
- Glycérine.
- Lactate, succinate.

Avec le pyruvate, le citrate et le malate, l'activité déshydrogénasique était très faible.

IV. — ACIDES ORGANIQUES ÉLABORÉS PAR PSEUDOMONAS CATTLEYAEOLOR

I. - Recherche de ces acides :

De même que nous avons recherché les amino-acides libres prenant naissance sous l'action de *Ps. cattleyaeolor*, nous nous sommes efforcé d'identifier les acides organiques libres pouvant se trouver dans des milieux de culture en fonction de la source de carbone qui était fournie à la bactérie.

Nous avons utilisé le milieu minéral synthétique de base M.B. auquel était incorporé 0,5 % de nitrate d'ammonium et 1 % d'éléments apportant le carbone. Ce milieu est réparti en fioles d'ERLENMEYER (100 ml par fiole) et stérilisé à l'autoclave ou par filtration sur bougie, suivant la nature de la source de carbone, le pH final étant de 6,8.

Les lots de flacons étaient mis à l'étuve à 25°C pendant 3 et 10 jours ; puis on procédait à l'extraction et à l'identification des acides.

Les acides organiques fixes étaient extraits soit par l'éther acide soit par passage sur résines échangeuses d'ions ; ils étaient ensuite recherchés par chromatographie sur papier.

Les céto-acides ont été caractérisés par la méthode de CAVALLINI et FRONTALLI (Cf. p. 28).

Les acides volatils ont été séparés et identifiés suivant la technique de GUILLAUME (Cf. p. 29).

Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau XXVI, page 94.

Les acides organiques retrouvés concordent en général avec ceux produits dans les expériences effectuées avec des bactéries non proliférantes. On remarque cependant que l'acétate n'est pas une source de carbone favorable à la croissance de *Ps. cattleyaecolor*, bien que ce germe soit capable, à l'état de « restings-cells », d'oxyder fortement cet acide. Il reste cependant vivant dans le milieu car si l'on réensemence celui-ci, sur L_1 par exemple, on constate une culture et une chromogénèse normale.

L'acide acétique est le seul acide volatil retrouvé dans les cultures. Il provient certainement de la décarboxylation oxydative du pyruvate.

2. - Dosage des céto-acides :

Les céto-acides présentent un intérêt particulier. En effet, on admet généralement qu'ils sont les intermédiaires permettant le passage de l'azote minéral à sa forme organique, l'ammoniaque ou l'hydroxylamine se combinant avec eux pour donner finalement naissance aux amino-acides dicarboxyliques (acide aspartique et glutamique) ou à l'alanine d'où dérivent les autres amino-acides par le processus de transamination.

Nous avons donc suivi l'évolution quantitative des céto-acides dans les différents milieux de culture. Ces acides étaient extraits par la technique de CAVALLINI et FRONTALLI et dosés ensuite colorimétriquement de la manière suivante : en ajoutant à 0,1 ml de solution extractive ammoniacale, 5,9 ml de solution $\left\{ \begin{array}{l} \text{Na}_2\text{CO}_3 \text{ 10 \%} \\ \text{Na OH 2 N} \end{array} \right\}$ P.E.

Il se développait alors une coloration rouge brun, dont le maximum d'intensité était atteint au bout de 15 minutes. La D.O. était alors lue à 5.200 Å.

Si la coloration est trop intense, il est possible de diluer avec la solution alcaline de carbonate de sodium + soude.

La solution témoin était faite à partir de solutions à 1 % des acides pyruvique et α -cétoglutarique ; elle a été réalisée de la manière suivante :

- 0,1 ml de solution étalon de DNP* pyruvique.
- 0,1 ml de solution étalon de DNP α -cétoglutarique.
- 5,8 ml de liquide alcalin de dilution.

Elle correspond, en raison des conditions d'expérience, à 0,0016 gr d'acide cétonique. L'extraction était faite suivant la méthode de CAVALLINI.

Nous avons d'autre part réalisé l'extraction et l'identification chromatographique des amino-acides présents dans ces milieux. Nous avons noté la présence d' α -alanine ou (et) d'acide glutamique dans tous les milieux, sauf celui à l'acétate. L'acide aspartique a été en plus caractérisé dans le milieu L_1 (où il doit provenir de l'hydrolyse de l'asparagine sous l'action de l'asparaginase de *Ps. cattleyaecolor*).

* DNP = 2-4-dinitrophénylhydrazone.

TABLEAU XXVI

ACIDES ORGANIQUES
ÉLABORÉS PAR PSEUDOMONAS CATTLEAECOLOR
A PARTIR D'UNE SEULE SOURCE DE CARBONE

● = présence de pigment rouge-violet.

Temps culture	3 jours			10 jours		
Acides trouvés	fixes	cétoniques	volatils	fixes	cétoniques	volatils
SUBSTRAT						
Acétate	—	—	acétate	—	—	acétate
α -cétoglut. ...	—	α -cétoglut.	—	citrate (faible)	α -cétoglut.	—
Citrate	citrate	α -cétoglut.	—	citrate	α -cétoglut.	—
Fumarate	fumarate malate	—	—	● fumarate malate	pyruvate	—
Lactate	lactate	—	—	● lactate	pyruvate	acétate
Malate	malate	pyruvate	—	● malate	α -cétoglut. (faible) pyruvate	—
Pyruvate	succinate	pyruvate	—	● succinate	pyruvate	acétate
Succinate	succinate	—	—	● lactate (faible) succinate malate	α -cétoglut.	—
Glucose	citrate	α -cétoglut. pyruvate	—	● citrate	—	—
Glycérine	citrate	α -cétoglut. pyruvate	—	● citrate	pyruvate (faible)	—
L ₁ N	citrate lactate	pyruvate	—	● citrate succinate	pyruvate	—

Les résultats, exprimés en g d'acides cétoniques %, sont rassemblés dans le tableau XXVII.

Les céto-acides jouent donc chez *Ps. cattleyaecolor* le rôle attendu de « fixateurs » d'azote, permettant ainsi l'élaboration des substances azotées nécessaires à sa croissance et sa multiplication ; ils se trouvent dans tous les milieux à des taux variables suivant le temps et la nature de la source de carbone mais leur présence est constante.

TABLEAU XXVII

**DOSAGE DES CÉTO-ACIDES DANS LES MILIEUX DE CULTURE
DE *PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR*
EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS ACIDES ORGANIQUES**

Céto-acides g/%			
Substrats	Teneur initiale	Culture de	
		3 jours	10 jours
Acétate	—	—	traces
α -cétoglut.....	1,02	0,60	0,62
Citrate	0	0,42	0,26
Fumarate	0	0,07	0,18
Lactate.....	0	0,05	0,25
Malate	0	0,11	1,32
Pyruvate	0,98	0,75	0,59
Succinate	0	0,07	0,63
Glucose	0,03	0,21	0,02
Glycérine	0	0,28	0,04
L ₁ N	0,04	0,46	0,07

V. — CONCLUSIONS

En conclusion, *Ps. cattleyaecolor* dégrade le glucose (et la glycérine) en passant par le stade pyruvate. Les différents acides organiques ainsi que les produits résultant de leur métabolisation que ce germe peut utiliser, prouvent que leur dégradation se fait grâce à l'existence d'un cycle semblable au cycle tricarboxylique de KREBS (au sort de l'acide acétique près).

En ce qui concerne l'acide acétique nous avons déjà vu que :

1. — *Ps. cattleyaecolor* était pratiquement incapable de l'utiliser comme source de carbone.

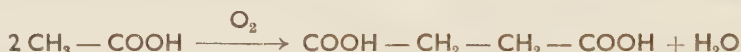
2. — A l'état de « restings-cells », *Ps. cattleyaecolor* l'oxyde. C'est ainsi que l'on retrouve dans le milieu une faible quantité d'acide pyruvique mais qui ne rend pas compte de l'intensité de l'oxydation.

3. — Ceci nous a conduit à mettre en contact avec cet ion (acétate Na à 1,30 % dans du tampon phosphate à pH = 6,9) une suspension très dense (90 mg N bactérien) de germes et ceci pendant un temps court (1 heure) à 25° C.

Nous avons pu alors identifier, outre l'acide pyruvique, de l'acide succinique. Celui-ci ne provient pas d'une lyse bactérienne car le témoin sans acétate, chromatographié dans les mêmes conditions, ne donne pas de spot d'acide succinique.

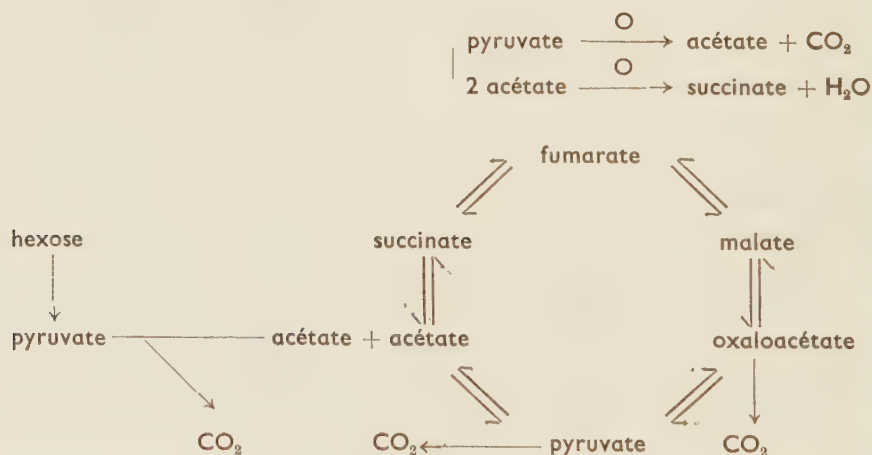
On pourrait penser que cet acide est un produit de catabolisme de l'acide pyruvique ; cette hypothèse est insoutenable puisqu'on ne retrouve aucun intermédiaire tel que acides citrique, α -cétoglutarique.

Il serait plus naturel de concevoir une transformation directe par oxydation de 2 molécules d'acide acétique.



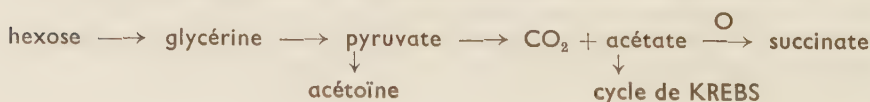
Cette hypothèse est d'autant plus séduisante qu'un tel processus d'oxydation a déjà été démontré chez des bactéries telles que *Escherichia coli*, *Aérobacter*, etc... [AJL - 5 - 7 - 8 - 9].

Le schéma suivant serait proposé :



(Cycle dicarboxylique de SZENT-GYORGYI)

Ps. cattleyaecolor serait donc capable d'utiliser les voies suivantes :



Tout ce qui précède, nous a permis de préciser les points essentiels du métabolisme azoté et carboné de *Ps. cattleyaecolor* et d'en dégager certaines caractéristiques intéressantes (rôle assimilatif et respiratoire du nitrate, voies de dégradation du pyruvate, par exemple). Dans une troisième partie de ce travail nous allons tenter d'élucider les incidences possibles du métabolisme de ce germe, placé en présence de substrats variés, sur sa chromogénèse, et d'une manière plus large, d'étudier l'action des différents facteurs conditionnant ce pouvoir chromogénétique. Nous étudierons ensuite le pigment lui-même et à la lumière de tous les faits ainsi acquis, il nous sera possible de tirer quelques conclusions sur l'origine et le rôle de ce pigment.

PARTIE III

LA CHROMOGÉNÈSE DE PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR

La production de pigments par les bactéries est connue de longue date. Elle a fait l'objet d'une foule de travaux relatés dans une abondante littérature.

L'étude de ces pigments fut d'abord orientée vers leur élaboration par les cellules bactériennes et les conditions physiques ou chimiques influençant cette production. L'on s'intéressa ensuite à leur structure chimique puis à leur rôle. La détermination des structures possibles a posé de difficiles problèmes techniques, en raison du faible rendement des germes en pigment. Cependant, grâce aux méthodes de micro-analyse, on est arrivé à élucider la formule de constitution de certains d'entre eux et même, dans certains cas, à en réaliser la synthèse. Citons à ce sujet les magnifiques travaux de WREDE et ELEMA (1928) sur la pyocyanine, de KÖGL et POSTOWSKY (1932) sur la chlororaphine, de WREDE et HETTCHE sur la prodigiosine (1929). On ignore encore cependant, et même actuellement beaucoup du rôle possible de ces pigments ; tout au plus a-t-il été remarqué que certains d'entre eux sont susceptibles d'oxydo-réduction [pyocyanine : FRIEDHEIM - 63].

Depuis longtemps déjà la chromogénèse bactérienne a fait l'objet de nombreuses recherches au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie de NANCY. Dès 1911, LASSEUR [100] avait étudié le rôle des glucides sur la fluorescence provoquée par *B. chlororaphis* dans le milieu où on le cultivait. Il reprit ensuite avec ses collaborateurs de 1928 à 1946 l'étude de l'influence de conditions très diverses (pH, lumière, sources de carbone et d'azote, éléments minéraux, etc...) sur le pouvoir chromogénétique de nombreuses espèces bactériennes [101 - 103 - 104 - 105 - 106].

J.G. MARCHAL et coll. ont poursuivi ces recherches, s'attachant plus particulièrement à l'étude du rôle des oligo-éléments [4 - 127] et des sources d'azote [131] sur la chromogénèse de deux nouvelles espèces bactériennes qu'il avait découvertes : *B. roseus* fluorescens et *Ps. cattleyaecolor*. Il se tourna alors vers l'étude de ces pigments eux-mêmes, mettant au point une méthode d'extraction commode de ceux-ci [120] et précisant la présence de fer [125] dans leur molécule, leur structure probable [126], leur influence sur la respiration d'autres germes [133].

Nous avons déjà signalé que *Ps. cattleyaecolor* produisait, en milieu synthétique convenable (milieu L₁) un pigment rouge-violacé hydrosoluble, apparaissant dans le bas du tube, au contact du précipité de phosphates de fer et de Ca qui y sont rassemblés, après 4 à 5 jours de culture, pour diffuser ensuite sur toute la hauteur de la colonne liquide. Bien que cultivant très bien sur les milieux bactériologiques usuels, ce germe n'y détermine cependant aucune production de pigment. Ceci n'est pas étonnant, car on sait que les pigments bactériens exigent des conditions précises pour se manifester : si

certaines bactéries produisent leur pigment sur les milieux usuels (*Pseudomonas aeruginos* et fluorescents, *Serratia marcescens*, etc...) d'autres exigent dans leur milieu la présence d'éléments carbonés, azotés et même minéraux très variés (*B. mesentericus*, *B. roseus* fluorescents, *Ps. cattleyaecolor*). Il faut d'ailleurs remarquer que la chromogénèse est une manifestation essentiellement variable, influencée par de nombreux facteurs, d'une manière souvent inexplicable. On note, entre autres, une influence saisonnière sur l'intensité de la pigmentation par une souche microbienne pure, cultivée constamment sur le même milieu et dans des conditions identiques.

Aussi nous sommes-nous tout d'abord proposé l'étude des facteurs conditionnant la chromogénèse de *Ps. cattleyaecolor*.

I. — FACTEURS CONDITIONNANT LA CHROMOGÉNÈSE

1. — Physiques.

Leur influence a été étudiée sur *Ps. cattleyaecolor* cultivé en milieu L_1 ; les essais ont toujours été effectués sur de nombreux tubes, en raison de l'intensité variable de la chromogénèse.

a. — Température.

Bien que *Ps. cattleyaecolor* soit capable de croître entre 15 et 38° C, la chromogénèse ne se manifeste que dans une zone de température comprise entre 18 et 28° C, avec un optimum vers 25° C.

b. — pH.

Nous avons fait varier le pH du milieu L_1 de 4 à 9. Le pigment était produit à un pH compris entre 5, 8 et 8,2 avec optimum pour un pH compris entre 6,5 et 7.

c. — Rayonnements.

La lumière ne semble jouer aucun rôle. L'intensité de la chromogénèse, de même que son apparition dans le temps, sont identiques, que la croissance de *Ps. cattleyaecolor* ait lieu à l'obscurité ou à la lumière.

Sous l'action des rayons U.V., l'arrêt de la chromogénèse va de pair avec celui de la croissance. Cependant, un temps de passage inférieur au temps léthal produit une stimulation très nette du pouvoir chromogénétique.

d. — Oxygène.

La présence d'oxygène est nécessaire : *Ps. cattleyaecolor* ne pousse pas en anaérobiose, sauf en présence de nitrate. Le nitrate agit en effet, comme nous l'avons vu, comme accepteur final d'hydrogène, remplaçant l'oxygène, absent dans ces conditions. Cette « nitrate-respiration » [176] s'accompagne elle aussi d'une production de pigment, plus faible toutefois qu'en aérobie normale.

La suroxygénation cependant fait disparaître la chromogénèse de *Ps. cattleyaecolor**. On la réalise expérimentalement en plaçant les tubes sur une couronne porte-tubes inclinées à 60° environ ; cette couronne est entraînée

* J.G. MARCHAL, expériences non publiées.

par un moteur à raison de 3 tours/minute. La surface du milieu exposée à l'air est donc maxima, la rotation augmente encore l'oxygénation. On constate alors une croissance luxuriante mais sans aucune production de pigment.

2. — Chimiques.

A. — Le fer.

La présence de fer est nécessaire à un certain taux, pour qu'apparaisse le pigment. *Ps. cattleyaecolor* est capable d'effectuer sa croissance dans un milieu où il n'a pas été ajouté de fer : la quantité de fer apportée en impureté par les différents constituants du milieu suffit à assurer celle-ci, mais elle n'est pas suffisante pour que puisse s'élaborer le pigment. Si, cependant, l'on ajoute à un tel milieu une solution **fraîche** de sel ferreux, la coloration violet cobalt caractéristique du pigment apparaît immédiatement. Le germe synthétise donc la partie organique du pigment, le "précurseur incolore", qui donne en présence de sel ferreux une coloration intense et immédiate. Seule la forme ferreuse permet l'apparition de cette coloration, l'ion ferrique est absolument sans action.

Si le fer se trouve dans le milieu à une concentration égale ou supérieure à 10^{-6} (teneur du milieu L_1 : 4×10^{-5} en Fe^{+2}) le pigment apparaît alors directement dans le milieu.

Dans un milieu enfin absolument privé de fer, la bactérie ne se développe pas et le milieu reste indéfiniment stérile. Pour obtenir une élimination aussi complète que possible du fer dans les milieux, nous avons eu recours à la méthode de WARING et WERKMANN [206] qui utilise la 8-hydroxyquinoléine (oxine) donnant avec le fer et d'autres métaux plurivalents (Cu, Ni, Mn, etc...) un chélate coloré et insoluble dans l'eau mais soluble dans le chloroforme.

On opère de la manière suivante :

A 500 ml de milieu, on ajoute environ 10 mg d'oxine et 2 ml de chloroforme on agite alors vigoureusement pendant 5 minutes, puis laisse reposer au moins 1 heure. Au bout de ce temps, on traite par 3 fois avec 5 ml de chloroforme et soutire la couche inférieure chloroformique colorée en vert plus ou moins foncé (oxinate de fer). On recommence alors cette série d'opérations jusqu'à ce que la couche chloroformique reste incolore, après adjonction d'oxine : 3 opérations suffisent généralement. On s'assure alors de l'élimination totale de l'oxine du milieu en mélangeant les phases chloroformiques recueillies et incolores à une solution aqueuse de sel ferrique : il ne doit apparaître aucune coloration dans le chloroforme. Les ballons, préalablement traités par l'eau régale puis rincés à eau purifiée par passage sur colonne de résines ($p = 2,8. 10^6 \Omega$), sont remplis de milieu, bouchés par de la feuille d'aluminium puis stérilisés, ce qui permet en même temps l'élimination du chloroforme dissous par évaporation.

Le fer peut être ajouté dans les milieux sous formes diverses : nous avons utilisé les sulfates ferreux et ferrique, le sel de Mohr, l'alun ferrique, le chlorure ferrique, le citrate ferro-ammoniacal, l'oxalate ferreux.

Les meilleurs résultats cependant ont été obtenus par l'adjonction de sels ferreux, aussi employons-nous couramment le sulfate ferreux ($FeSO_4, 7 H_2O$).

Il faut remarquer que même les sels de fer insolubles (oxalate) sont utilisables. D'ailleurs, dans le milieu L_1 , le sulfate ferreux se combine et précipite sous forme de phosphates. Le pigment apparaît cependant mais d'abord dans le bas du tube, ce qui suppose donc une libération du fer à partir du précipité.

Il y a donc lieu de retenir de tous ces faits que si la croissance exige des traces de fer, la chromogénèse n'est compatible qu'avec des concentrations en fer plus importantes.

1. — En milieu absolument privé de fer, il n'y a ni croissance ni chromogénèse.

2. — En milieu où le fer est uniquement présent sous forme d'impureté apportée par les différents constituants du milieu, il y a croissance mais non chromogénèse ; cependant, l'adjonction à ce milieu d'une solution d'ions ferreux entraîne l'apparition immédiate et constante de la coloration violet cobalt du pigment de *Ps. cattleyaecolor*, ce qui indique que le précurseur incolore de ce pigment se forme sans le secours ou avec une trace infime de fer.

3. — En milieu enfin, contenant du fer à une concentration seuil, il y a production de pigment et croissance, quelle que soit la forme d'apport du métal ; l'ion ferreux semblant toutefois préférable.

Parmi les autres éléments minéraux, le phosphate, sulfate, magnésium et calcium sont nécessaires ou favorisent la production du pigment, ils n'entrent cependant pas dans sa constitution.

B. — Sources de carbone.

Pour effectuer cette étude nous avons été amené à réaliser de nombreuses cultures dans lesquelles variait la nature de l'élément carboné. Nous nous bornerons donc à signaler les résultats positifs.

Nous avons cultivé *Ps. cattleyaecolor* à 25° C dans le milieu suivant, milieu synthétique de base dont nous rappelons ici la composition :

K ₂ H 4PO ₄	0,25 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O	0,50 g
CaCl ₂	0,04 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,01 g
Eau.....	Q.S.p. 100 ml

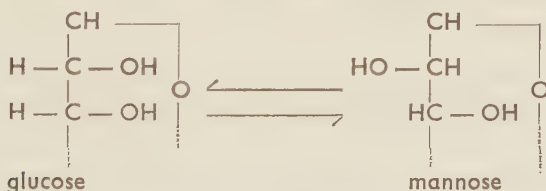
additionné de 0,5 % NH₄NO₃ et de 1 % de substance carbonée. Nous considérons la source comme impropre à la chromogénèse, lorsque le pigment n'est pas apparu après un laps de temps de 15 jours (le temps normal d'apparition était de 4 à 6 jours).

a. — Glucides et dérivés :

Bien que de nombreux oses permettent une croissance normale, 3 seulement peuvent assurer la chromogénèse :

glucose
mannose
glycérine.

Nous avons vu que la glycérine est un intermédiaire du catabolisme du glucose chez *Ps. cattleyaecolor* et que l'inhibition de l'énolase de ce germe peut être obtenue sous l'action du NaF. D'autre part, le mannose est épimère du glucose : on en connaît un enzyme (la mannose-6-phosphate isomérase) permettant de passer du premier au second [LELOIR - 108].



Avec le glucose, le mannose et la glycérine comme source de carbone, le pigment apparaît entre le 3^e et le 7^e jour (au 5^e jour avec le mannose).

b. — Acides organiques :

Un certain nombre d'entre eux (voir tableau XXVI, p. 94) permettent la chromogénèse mais avec le pyruvate et le lactate, l'intensité pigmentaire est comparable à celle obtenue avec la glycérine.

c. — Acides aminés :

Ces corps ont été étudiés en tant que donateurs d'azote, mais du fait de leur squelette carboné, certains d'entre eux sont utilisables pour la croissance et la chromogénèse de *Ps. cattleyaecolor* qui peut trouver en eux à la fois la source de carbone et la source d'azote.

Ce sont la glycine, la sérine, l'histidine, et, à un taux beaucoup plus faible, l'acide glutamique. Notons en passant que si l'asparagine permet la croissance de *Ps. cattleyaecolor*, celui-ci, en sa présence comme seule source d'azote et de carbone, ne produit pas de pigment.

On ne peut malheureusement dégager aucune conclusion positive entre la structure chimique d'un corps carboné et son rôle dans la production du pigment. La seule chose que l'on puisse dire c'est que *Ps. cattleyaecolor* utilise des corps carbonés de constitution simple pour en réaliser la synthèse.

C. — Sources d'azote.

Comme nous le verrons lors de l'étude chimique du pigment, celui-ci renferme une certaine proportion d'azote dans sa molécule. Aussi nous sommes nous demandé sous quelle forme cet élément pouvait entrer dans la molécule, en recherchant les corps azotés susceptibles de faire apparaître la fonction pigmentaire.

Nous avons opéré dans les mêmes conditions que dans le chapitre précédent. La source de carbone (glucose, glycérine, lactate) était ajoutée à une concentration uniforme de 1 % et les différentes sources d'azote aux taux suivants :

- 0,5 % pour les formes minérales,
- 1 % pour les formes organiques.

a. — Azote minéral :

Les formes utilisées sont : NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$, NH_4NO_3 . Les résultats obtenus concordent avec ceux concernant la croissance : le nitrate ou l'ion ammonium qui provoquait une croissance lente et faible donnent aussi une chromogénèse discrète et longue à apparaître. Au contraire, en présence de NH_4NO_3 (ou d'un mélange d'un nitrate et d'un sel d'ammonium) on obtient une croissance et une chromogénèse beaucoup plus rapides, comparables à celles obtenues en milieu L_1 . Dans ces conditions, le pigment apparaît même en anaérobiose ; un excès d'oxygénation, au contraire, nuit à son apparition.

b. — Azote organique :

1. — Amino-acides :

Parmi les acides aminés testés, seules la glycine, l' α -alanine, la sérine, l'arginine, l'hydroxyproline (mais non la proline) et l'histidine permettent une chromogénèse normale.

2. — Amides :

L'asparagine et l'urée sont d'excellentes sources d'azote pour l'élaboration du pigment de *Ps. cattleyaecolor* ; la glutamine au contraire n'a provoqué

qu'une mauvaise croissance et le milieu est resté incolore. L'asparagine, utilisée comme source d'azote et de carbone, permet la croissance mais non la chromogénèse ; l'urée, elle, ne permet ni l'une ni l'autre.

3. — Autres corps azotés :

Les corps azotés polycondensés (peptones, albumines, gélatine) provoquent une croissance plus ou moins abondante, mais sans pigment. Il en est de même pour différents hétérocycles azotés : bases puriques (guanine, adénine, acide urique), pyrrole, pipéridine, morpholine, que nous avons utilisés à la suite d'essais de détermination de la structure du pigment de *Ps. cattleyaecolor*. Signalons que, pour des raisons de solubilité ou de toxicité, ces dérivés hétérocycliques ont été ajoutés aux milieux à la concentration de 0,1 %.

Comme pour les sources de carbone, la diversité de constitution des corps azotés employés et les différences observées dans l'utilisation de corps parfois très voisins (proline et hydroxyproline) ne nous permettent guère de tirer à priori, des conclusions valables. Il est certain toutefois que l'azote incorporé dans la molécule du pigment lors de la synthèse de celui-ci, l'est sous forme très simple, probablement l'ammoniaque. Deux séries de faits appuient cette hypothèse :

1) *Ps. cattleyaecolor* est capable de donner naissance à l'ion NH_4^+ à partir de **tous** les corps permettant la chromogénèse, quel que soit le processus en jeu : ionisation (sels d'ammonium), réduction (nitrate), désamination (acides aminés) et hydrolyse (arginine, amides).

2) Il est au contraire incapable d'utiliser certains corps plus complexes tels que les amino-acides ou certains hétérocycles qu'il ne peut métaboliser, même si ceux-ci se rapprochent de la structure du pigment (pyrrol).

3. — Action des antibiotiques.

Outre leur intérêt clinique, les antibiotiques permettent l'étude de certains métabolismes, en bloquant en des points variés les chaînes de réaction, biologiques et ceci de manière variable : par compétition avec un substrat, par inactivation d'enzymes, par complexation avec un métal. Ce dernier mode d'inhibition en particulier doit être l'origine probable de l'action antibiotique de certains d'entre eux (tétracyclines), INH, cyclosérine). Les connaissances actuelles à ce sujet ont été mises au point récemment par TEILLON et VELU [194].

Aussi, après avoir apprécié par les méthodes classiques (biphotométrie, technique de diffusion sur milieu solide*) la sensibilité de *Ps. cattleyaecolor* aux antibiotiques seuls, avons-nous étudié l'incidence possible de certains d'entre eux sur la chromogénèse de *Ps. cattleyaecolor*.

Comme les *Pseudomonas* en général, *Ps. cattleyaecolor* est assez résistant aux antibiotiques. Seuls le chloramphénicol et, à un moindre degré, la néomycine, inhibent sa croissance d'une manière nette.

Nous avons observé que la streptomycine a d'abord une action empêchante puis au bout d'un certain temps, la croissance du germe reprend brutalement, malgré la présence de l'antibiotique.

* Cette méthode consiste à déposer, sur un milieu solide coulé en boîte de PÉTRI et déjà ensemencé, d'une manière aussi uniforme que possible, avec le germe dont on veut déterminer la sensibilité, des petits disques de papier imprégnés des différents antibiotiques à tester. L'antibiotique diffuse dans la gélose autour du disque, son gradient de concentration diminuant en raison inverse de la distance. L'aire d'inhibition de croissance des germes sensibles provoquée par cette diffusion de l'antibiotique autour du disque sera d'autant plus grande que le germe ensemencé sera plus sensible à l'antibiotique considéré.

Pour constater le retentissement possible de l'action de ces antibiotiques sur la chromogénèse, nous avons réensemencé, en milieu L_1 , des bactéries prélevées soit :

1) Lors de l'étude biophotométrique, en réensemencant en L_1 un prélèvement effectué dans les cuves contenant la dose d'antibiotique immédiatement inférieure à celle ayant provoqué l'arrêt total de la croissance. Des tubes de référence étaient ensemencés à partir de la culture de la cuve témoin ne contenant pas d'antibiotique.

2) Dans la méthode de diffusion, en effectuant un prélèvement au voisinage immédiat de l'aire d'inhibition déterminée par l'antibiotique, les témoins étaient pris dans la partie de la culture située loin de ces disques.

Pénicilline et chloramphénicol exceptés, les antibiotiques lèsent nettement la fonction pigmentaire de *Ps. cattleyaecolor* : pour la chlortétracycline (auréomycine) par exemple, il a fallu jusqu'à 8 passages sur milieu neuf pour voir réapparaître une chromogénèse normale.

4. — Existence d'un autre pigment violacé chez *Pseudomonas cattleyaecolor*.

Dans les milieux où la source de carbone était constituée par le pyruvate et la source d'azote par l'acide aspartique, l'arginine ou le nitrate d'ammonium, nous avons noté l'apparition d'une coloration violet-mauve passant ensuite au bleu : ce phénomène précède l'apparition du pigment normal. Cette coloration apparaissait dans le milieu des tubes, était très fugace et disparaissait par simple agitation à l'air. En raison de l'existence inconstante de ce corps et surtout de sa grande instabilité, nous n'avons pu en faire l'étude approfondie.

Ce pigment n'est pas dû à une contamination accidentelle des cultures. D'autre part, C.M. GRANDJEAN-RADOVITCH [72] avait déjà observé au Laboratoire la production d'un pigment semblable par une autre espèce bactérienne chromogène : *Bacillus roseus fluorens*. Devant sa fugacité, elle n'avait pu également en approfondir l'étude. Elle avait noté que le pigment disparaissait par simple contact avec l'oxygène atmosphérique.

II. — LE PIGMENT DE *PSUDOMONAS CATTLEYAECOLOR*

Après avoir envisagé les conditions d'apparition et de production du pigment produit par *Ps. cattleyaecolor*, nous avons tenté d'élucider sa structure, ses propriétés et son rôle dans la vie de la bactérie.

I. — Généralités sur les pigments microbiens.

Depuis une trentaine d'années, de nombreux auteurs se sont penchés sur les problèmes soulevés par les pigments d'origine bactérienne. De leurs études, il résulte que ces substances présentent des structures chimiques très variées. Leur rôle dans la vie de la bactérie est peu connu et les observations rassemblées jusqu'à présent n'ont encore permis que de faire un certain nombre d'hypothèses. Il semble à priori que la chromogénèse n'est pas une fonction indispensable à la vie de la bactérie car bon nombre de germes chromogènes donnent aussi bien des cultures incolores que des cultures vivement colorées. Pour certains d'entre eux même, tel *Ps. cattleyaecolor*, qui poussent fort bien sur les milieux bactériologiques usuels, l'apparition de pigment n'a lieu que dans des milieux bien déterminés et sous certaines conditions. Il est cependant des cas où la chromogénèse est une fonction utile et nécessaire : c'est grâce à leur pigment (bactério-purpurine) que les Thiobactéries par exemple fixent l'énergie lumineuse nécessaire à la réduction de CO_2 , H_2S étant donateur

d'hydrogène. Enfin certains pigments sont doués de propriétés d'oxydoréduction, mais l'on ne sait encore exactement dans quelle mesure ils peuvent conditionner le métabolisme de la bactérie productrice.

Suivant leur nature, les pigments bactériens ont des propriétés physiques et chimiques variables. Leurs caractères de solubilité en particulier permettent de les séparer en pigments diffusibles dans le milieu (grâce à leur solubilité dans l'eau) ou au contraire restant fixés aux corps bactériens, en raison de leur insolubilité.

En se basant sur leur solubilité dans l'eau et sur leur structure chimique on a tenté de la classer de la manière suivante :

A. — Pigments plus ou moins solubles dans l'eau, donc diffusibles.

Ils peuvent être de nature :

- Flavinique } pigments fluorescents de nombreuses bactéries
- Ptéridinique }
- Phénazinique : pyocyanine, chlororaphine.
- Inconnue : pigments diversement colorés, produits par des bactéries sporulées (*B. subtilis*, *mesentericus*, *lactis niger* Gorini).

B. — Insolubles dans l'eau mais solubles dans les solvants organiques

Ils appartiennent au groupe des :

- Caroténoïdes : pigment du staphylocoque, de certaines mycobactéries et levures.
- Pyrroles : prodigiosine
 violacéine
 bactéριοchlorophylles.

La présence d'éléments métalliques dans une molécule de pigment bactérien est un fait assez rare. On sait que la bactériochlorophylle contient du magnésium. TOBIE [1936 - 195] a pu caractériser du fer dans les cendres provenant de la calcination de la violacéine ; de même WILLIAMS et coll. [1956 - 208] ont pu trouver le même élément dans les cendres obtenues à partir de la prodigiosine. Grâce à l'emploi de la méthode polarographique, MARCHAL et ADAMS [125] ont pu identifier le fer dans les pigments produits par *Bacillus roseus fluorescens* et *Ps. cattleyaecolor*.

Le rôle des pigments (bactériochlorophylle mise à part) est beaucoup plus discuté : certains d'entre eux (pyocyanine, flavine) sont oxydoréductibles, ce qui leur confère au moins dans certaines conditions un rôle respiratoire possible [13]. Quant aux autres, le problème reste encore entier.

Le pigment produit par *Ps. cattleyaecolor* appartient au groupe des substances diffusibles mais nous remarquons déjà qu'il apporte au monde de ces pigments bactériens un élément nouveau, inconnu encore : la présence d'un élément métallique, séparable mais nécessaire à la coloration.

2. — Extraction du pigment.

Deux méthodes, mises au point au laboratoire, peuvent être utilisées :

a — L'une, imaginée par J.G. MARCHAL [124], est la suivante :

Des cultures de *Ps. cattleyaecolor* en milieu L_1 âgées de 20 à 30 jours sont centrifugées. On acidifie le surnageant et ajoute environ 5 à 10 % de la

solution en poids d'acide phosphotungstique. Celui-ci forme, avec les protéines présentes, un précipité colloïdal sur lequel vient s'adsorber le pigment. Le précipité séparé par centrifugation est mis en suspension dans le minimum d'eau puis il est traité par la baryte. Le pigment passe en solution. Le phosphotungstate Ba formé est éliminé par centrifugation. Dans la solution obtenue on fait passer un courant de CO_2 pour éliminer Ba^{++} en excès. On filtre et évapore la solution de pigment sous vide et à basse température (50°C maximum). On obtient ainsi une laque que l'on peut soumettre à une purification.

b — Dans l'autre technique (proposée par M. POUTEAU-THOUVENOT) : le liquide clair provenant de la centrifugation des milieux de culture est agité avec 40 % (en poids) de sulfate d'ammonium. Après dissolution, on laisse au moins 2 heures à la glacière ; on centrifuge et sature le surnageant par du sulfate de sodium ; on extrait alors par l'éthanol à 95° (le pigment se concentre dans la couche hydro-alcoolique supérieure) jusqu'à ce que l'alcool soit incolore. Les solutions alcooliques sont réunies et traitées par un égal volume d'éther. La couche inférieure, contenant le pigment est soutirée puis évaporée sous vide comme précédemment.

En opérant de la même manière avec des cultures faites sur milieu sans fer, il est possible d'extraire le précurseur incolore du pigment. On peut suivre les progrès de cette extraction en faisant des réactions à la touche avec une solution de FeSO_4 (indicateur externe) qui donne immédiatement la coloration rouge caractéristique du pigment.

3. — Purification.

Après de nombreux essais nous avons adopté la méthode de purification suivante qui semble nous avoir donné un pigment à l'état sensiblement pur et qui était suivie par la détermination des rapports :

$$\frac{\text{D.O.* pigment à } 2.780 \text{ \AA}}{\text{D.O.* pigment à } 2.100 \text{ \AA}} \quad \text{et} \quad \frac{\text{D.O. à } 2.780 \text{ \AA}}{\text{teneur en fer}}$$

En effet, il est possible, comme nous aurons l'occasion de le voir, de séparer et doser le fer entrant dans la constitution de ce pigment et d'observer au spectrophotomètre deux maxima d'absorption dans la région U.V. du spectre à 2.100 Å et 2.780 Å.

Dans un premier temps, les solutions évaporées étaient reprises par l'éthanol à 95° auquel on ajoutait quelques cristaux de sulfate ferreux pour compenser les pertes en fer qu'a pu subir le pigment au cours de l'extraction. La saturation en fer du pigment est appréciée par polarographie. Le fer combiné à ce pigment n'est pas ionisable ; d'autre part, la partie organique du pigment donne une vague polarographique que ne donne pas le pigment total. Le fer en excès est éliminé en le complexant avec l'oxine, l'oxinate de fer étant extrait par le chloroforme dans lequel il est soluble ; on évapore alors et redissout dans l'éthanol. On continue ces suites de dissolution et d'évaporation jusqu'à solubilité totale dans le minimum d'éthanol.

Dans un second temps, la solution limpide est versée sur colonne de cellulose de 10 cm de haut sur 1 cm de diamètre, que l'on élue ensuite avec de l'éthanol absolu. La colonne retient un composé fluorescent orangé. Le liquide obtenu est évaporé à sec sous vide et dissous dans le minimum d'eau.

Dans un troisième et dernier temps enfin, on soumet la solution aqueuse obtenue à l'électrophorèse continue (appareil de SHANDON). On travaille sous tension de 800 V. et avec une intensité de 1,5 mA, dans l'acide acétique à 5 % ($\text{pH} = 2,4$).

* DO = densité optique.

Le pigment se sépare en 3 fractions :

α - Fraction rouge orangée, fluorescente en lumière de WOOD, celle-ci contient du fer libre.

β - Fraction rouge violacée, non fluorescente, dont le fer est combiné au précurseur incolore : c'est le pigment proprement dit.

γ - Fraction jaune, présentant une fluorescence intense en lumière de WOOD, ne contenant pas de fer.

La fraction α migre légèrement vers le pôle positif. Le liquide qui la contient donne après évaporation un produit épais et visqueux rouge orangé. Cette fraction contient une certaine quantité de fer libre et ionisé, mise en évidence par l'o. phénanthroline ou par polarographie. Par hydrolyse acide (ou alcaline) à froid comme à chaud, on n'obtient ni décoloration, ni libération de fer. De même, l'adjonction de fer ferreux ne provoque aucun changement de la coloration existante.

Cette fraction est légèrement fluorescente en lumière de WOOD. Son spectre montre un maximum d'absorption intense vers 2.100 Å et un autre, plus faible de 2.500 - 2.600 Å.

Elle ne semble donc pas constituer la partie organique du pigment puisqu'elle ne se colore pas par adjonction de fer et ne montre pas de maximum à 2.780 Å. Elle serait peut-être un précurseur du pigment, représentant probablement la partie pyrrolique de la molécule de celui-ci (le pyrrol en effet présente [PICKETT et al. - 165] un maximum d'absorption à 2.100 Å, son ϵ^* est de 10.000 à cette longueur d'onde).

La fraction β migrant légèrement vers le pôle négatif est le pigment proprement dit. Elle est rouge-violacée, non fluorescente. Elle ne contient pas de fer libre, mais du fer combiné, libérable par hydrolyse acide avec décoloration du pigment. Elle est, après évaporation, soluble dans eau et alcool. Elle est homogène à l'électrophorèse sur papier et à la chromatographie.

La fraction γ enfin, qui est jaune, migre fortement vers le pôle négatif. Elle est en faible proportion. Soluble dans eau et alcool, elle ne contient ni fer libre ni fer combiné. Elle présente une fluorescence à la lumière du jour et qui est très intense en lumière de WOOD. Son spectre montre 3 maxima : un à 2.250, un à 3.800 et à 4.500 Å ; caractéristique des substances de nature flavinique. Elle explique alors durant la culture de *Ps. cattleyaecolor* en milieu L_1 l'apparition aux premiers jours de culture d'un léger anneau fluorescent dans la partie supérieure du tube.

Cette méthode de purification est excellente, elle est malheureusement longue et d'un faible rendement. Nous avons pu en suivre la marche et l'évolution au cours des différentes étapes par l'étude de la mesure du rapport existant entre la teneur en fer du pigment et son absorption à une longueur d'onde où il présente un maximum. Nous avons d'abord adopté le rapport :

Densité optique à 2.100 Å

Teneur en fer combiné

mais nous avons constaté que dans les premiers temps de la purification existait une impureté possédant aussi un maximum d'absorption à cette longueur d'onde. Nous avons donc finalement considéré le rapport :

Densité optique à 2.780 Å

Teneur en fer du pigment

plus spécifique.

* ϵ = coefficient d'absorption moléculaire.

La densité optique a été mesurée à 2.100 et 2.780 Å en cellules de quartz de 1 cm (solutions où a été dosé le fer, diluées au 1/5). Le fer a été dosé sur 2 ml de prise d'essai après hydrolyse acide à chaud, par colorimétrie à l'acide de l'ortho-phénanthroline, selon la méthode détaillée p. III.

La colorimétrie de solutions non hydrolysées a été réalisée en même temps pour déterminer le fer libre pouvant exister au sein de la solution de pigment.

L'examen des chiffres obtenus, consignés dans le tableau XXVIII, permet de se rendre compte de la validité de la méthode suivie.

TABLEAU XXVIII

VALEURS DES RAPPORTS $\frac{\text{D.O. 2.780 \AA}}{\text{D.O. 2.100 \AA}}$ ET $\frac{\text{D.O. 2.780 \AA}}{\text{Teneur en fer}}$
AU COURS DE LA PURIFICATION DU PIGMENT
DE PSEUDOMONAS CATTLEYAEOLOR

Etapas de purification	D.O. 2100 Å	D.O. 2780 Å	$\frac{2780}{2100}$	Fe correspondant (μ g)		D.O. 2780 Å Fe combiné
				libre	combiné	
Résidu sec d'ex- traction	0,810	0,225	0,28	0,80	3,44	0,065
Après éthanol ab- solu	0,425	0,213	0,50	0,20	1,96	0,109
Après chromato- graphie sur Al ₂ O ₃	0,310	0,175	0,56	0,12	0,44	0,158
Après électro- chromatographie continue	0,245	0,145	0,59	0	0,80	0,182

4. — Propriétés physiques.

Le pigment tel que nous l'avons obtenu est constitué par une laque rouge violacée, incristallisable. Par dessiccation poussée sous vide (à 50-60° C) ou lyophilisation, il est possible d'obtenir une poudre amorphe; malheureusement, un très court séjour à l'air suffit à lui faire réabsorber l'humidité atmosphérique. Nous n'avons également pas pu obtenir un sel cristallisable à partir de ce pigment, (Picrate, chlorhydrate). La laque rouge est extrêmement soluble dans l'eau, le méthanol, l'éthanol, le propanol, légèrement soluble dans le butanol, l'acide acétique et la pyridine. Elle est pratiquement insoluble dans tous les autres solvants. Les solutions présentent une teinte rouge violacée caractéristique.

La solution aqueuse colorée est stable à froid, même en présence d'acides ou d'alcalis. Elle est également stable à chaud. Cependant, les acides ou les bases, même dilués la décolorent à ébullition en libérant du fer que l'on peut

caractériser. Le fer se recombine peu à peu et la coloration réapparaît par refroidissement. Le pigment s'est révélé homogène par chromatographie sur papier et à l'électrophorèse. Ces opérations ont été réalisées avec les mélanges suivants :

- 1) Butanol - ac. acétique - eau (v/v 40 - 10 - 50)
Rf = 0,18
- 2) Lutidine - eau (50 - 30)
Rf = 0,22
- 3) Isopropanol - HCl - eau (65 - 16 - 19)
Rf = 0,27

Les phases mobiles 2) et 3) avaient été préconisées par WILLIAMS et coll. [209] dans l'étude de pigments donnés par des bactéries du genre *Serratia*.

Il est à noter que, dans ces conditions, le pigment non purifié donne, en plus de spot rouge cattleya, une tache jaunâtre et fluorescente en lumière de WOOD, dont le Rf est toujours supérieur.

L'électrophorèse nous a permis, outre la vérification de la pureté du pigment, de déterminer son point iso-électrique. Celui-ci se trouve à pH = 2,9 (la solution aqueuse de pigment à 1 % a un pH de = 3,5).

Ce pigment est oxydo-réductible ; les valeurs de son potentiel d'oxydo-réduction (mesurées avec une électrode de platine et une électrode au calomel) par rapport à l'électrode normale à hydrogène sont, en solution à 1 % :

$$E^{\circ} \text{ à } 17^{\circ} \text{ C} = \begin{cases} +0,116 \text{ v. à pH} = 3,5 \\ -0,072 \text{ v. à pH} = 7 \end{cases}$$

ce qui donne un rH d'environ 14.

5. — Nature chimique.

a. — Présence de fer :

Le fer contenu dans le pigment s'y trouve à l'état ferreux. Il a été dosé de deux manières :

1. — Polarographie :

Nous opérons avec une solution 0,5 M d'oxalate de potassium comme électrolyte de support (5 ml). [Technique de ZUMAN - 214]. Cette solution est auparavant traitée par la 8-hydroxyquinoléine (oxine) dans le but d'éliminer le fer s'y trouvant à l'état d'impureté.

Cet électrolyte possède l'avantage suivant : nous savons que le fer existant dans la molécule de pigment n'est pas ionisable et qu'il faut l'en séparer par hydrolyse. Or nous avons constaté qu'un simple chauffage du pigment avec la solution d'oxalate, dans la cellule à polarographier, décolorait le pigment et permettait la libération du fer. Cet élément se recombine à froid, mais très lentement (plusieurs heures) par rapport à la durée de l'expérience (quelques minutes).

Le mode d'emploi suivant a été adopté :

Nous travaillons avec les constantes suivantes (appareil Radiometer) :

Mercure (vitesse de chute).....	XX gouttes/minute
Multiplicateur de tension	1 volt
Amortissement (Damping).....	4
Réduction de sensibilité	1 × 20
Sensibilité de l'amplificateur	50
Compensation du courant de diffusion .	3

On fait passer un courant d'azote (sans oxygène) dans la cellule pour éliminer l'oxygène dissous dans les différentes solutions.

Dans un premier temps, nous nous sommes assurés de l'absence de fer libre dans la solution de pigment en ajoutant à 5 ml de solution d'oxalate 0,1 ml de solution éthanolique de pigment à 0,25 % soit 250 μg . Nous avons constaté que la courbe polarographique obtenue est sensiblement identique à la courbe témoin.

Dans un second temps, nous avons libéré le fer du pigment par simple chauffage du mélange jusqu'à décoloration. Après refroidissement, nous avons enregistré la courbe. Nous avons constaté l'apparition de la « vague » caractéristique du fer, dont le potentiel de demi-vague est, dans cet électrolyte, d'environ $-0,25$ v. Nous opérons sur 0,1 et 0,2 ml de solution de pigment (250 et 500 γ), pour vérifier la proportionnalité entre la longueur des vagues et la teneur en fer ; nous constatons effectivement que les 2 vagues mesurent 10,5 et 20 mm (Fig. 9, polarogramme B).

Nous avons réalisé dans les mêmes conditions la polarographie de quantités connues de fer (ferreux). La comparaison de la longueur des vagues donnent une teneur de 18 μg . de fer pour 500 μg . de pigment (longueur de la vague donnée par le pigment : 20 mm ; longueur de la vague donnée par 22,4 μg . de fer : 25 mm) (Fig. 9, polarogramme A).

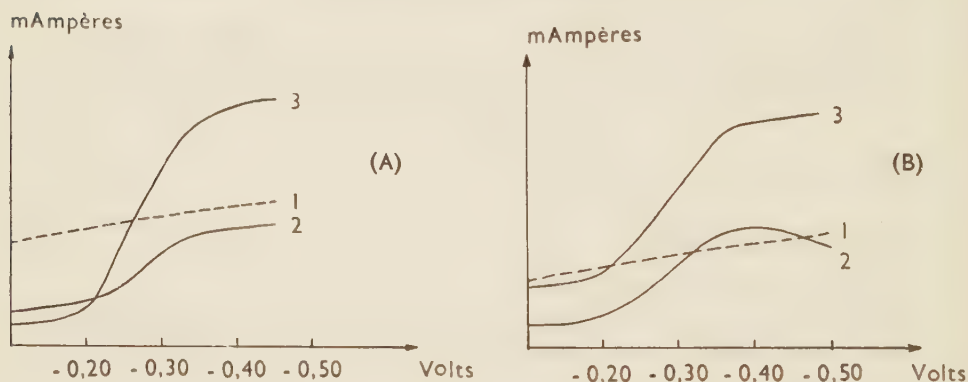


Fig. 9. — Dosage polarographique du fer contenu dans le pigment de *Pseudomonas Catfleyaeicolor*

(A) : Solution étalon de fer

Courbe 1 = 5 ml oxalate K 0,5 M.

— 2 = après addition de 5,6 μg . Fe^{++} .

— 3 = après nouvel apport de 16,8 μg . Fe^{++} .

(Soit, au total, 22,4 μg . Fe^{++}).

(B) : Pigment proprement dit

Courbe 1 = 5 ml oxalate K 0,5 M.

— 2 = après addition de 250 μg . de pigment décoloré par chauffage.

— 3 = après nouvel apport de 250 μg . de pigment décoloré par chauffage.

(Soit, au total, 500 μg . pigment).

Ceci représente une teneur de 3,6 % ; mais elle est en réalité supérieure pour la raison suivante : le pigment de la solution n'était pas totalement saturé en fer. Il est facile de le vérifier car, comme J.G. MARCHAL l'a montré, la partie organique constituant le précurseur incolore du pigment de Ps. cat-

tleyaecolor donne en oxalate K 0,5 M une vague polarographique dont le potentiel de demi vague est de $-0,91$ v. Le pigment obtenu en saturant de fer ce précurseur incolore ne donne plus cette vague.

Effectuant donc la polarographie de la solution de pigment, avant chauffage, dans une zone de potentiel convenable (entre $-0,70$ v. et $-1,20$ v.) nous avons constaté que dans la solution utilisée, 90 % seulement du pigment était saturé en fer (fig. 10).

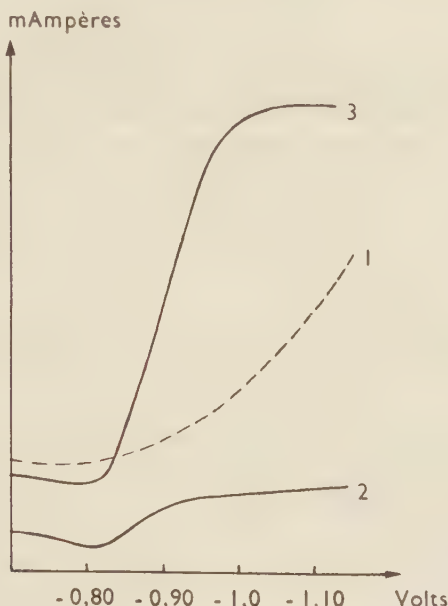


Fig. 10. — Polarogramme du pigment de *Pseudomonas Cattleyaecolor* (courbe 2) et de son précurseur incolore (courbe 3)

Courbe 1 = 5 ml oxalate K 0,5 M.

— 2 = après addition de 250 μ g. de pigment.

— 3 = solution de la courbe 2 ; après décoloration par chauffage.
(On constate que l'échantillon de pigment utilisé contient environ 10 % de précurseur incolore.)

La teneur réelle en fer de la molécule de pigment est donc de l'ordre de 4 %. C'est d'ailleurs ce que vérifie la colorimétrie que nous allons maintenant envisager.

2. — Colorimétrie :

Nous avons utilisé la réaction colorée spécifique que donne l'ion ferreux avec l'o.phénanthroline, en suivant la technique indiquée par CHARLOT [35]. On obtient une coloration stable, indépendante du pH dans de larges limites (de pH 2 à pH 9) dont la sensibilité est très grande. Dans nos conditions d'expériences, la mesure colorimétrique, effectuée à 4.800 Å sur des quantités connues de fer, nous a donné une droite pour des concentrations comprises entre 0,5 et 9 μ g. Fe^{++} par ml.

On opère en tampon acétate de pH = 4,5* et en présence d'hydroquinone en solution à 1 % dans le tampon acétate pour réduire tout le fer présent en fer ferreux. Les lectures photométriques sont faites à 4.800 Å ; après 1/2 heure de contact.

Le protocole expérimental a été le suivant (tableau XXIX) :

TABLEAU XXIX

**PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL
DU DOSAGE COLORIMÉTRIQUE DU FER DANS LE PIGMENT
DE PSEUDOMONAS CATTLEYAEOLOR**

Numéro des tubes	1	2	3	4	5	6
Solution de pigment à 2 % (ml) .	—	0,1	—	0,1	—	—
Solution pigment à 2 % contenant 280 µg Fe ⁺⁺ /ml (ml)	—	—	0,1	—	—	—
Solution de Fe ⁺⁺ à 56 µg/ml (ml)	—	—	—	—	0,1	0,5
Hydroquinone à 1 % (ml)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
o.phénanthroline 0,5 % (solution aqueuse) (ml)	0,2	0,2	0,2	—	0,2	0,2
Eau distillée (ml)	4,6	4,5	4,5	4,7	4,5	4,1
Concentration finale en fer en µg/ml	—	—	5,6	—	1,12	5,6

Le tube 1 est le témoin réactif.

Le tube 2 sert à déterminer le fer contenu dans le pigment. A cet effet, avant adjonction des différents réactifs, celui-ci est hydrolysé par 1 goutte de H₂SO₄N et porté à ébullition pour en libérer le fer.

Le tube 3 permet de vérifier le degré d'insaturation en fer du pigment utilisé (qui est un échantillon différent de celui utilisé lors du dosage polarographique) : on ajoute, à une quantité déterminée de pigment, un excès connu de fer. Le fer fixé par le pigment étant très lentement chélaté par l'o.phénanthroline (au moins 24 heures, durée de l'expérience : 30 minutes), le dosage de fer libre restant permet aisément de calculer, par différence, la quantité de fer fixée par le pigment.

Le tube 4 est un témoin pigment : en effet, celui-ci à 4.800 Å, a un certain pouvoir d'absorption qu'il est nécessaire de défalquer des densités optiques lues pour le tube 3. Cette absorption n'intervient pas pour le tube 2 où le pigment, hydrolysé, est incolore.

* CH₃ COOH 0,1 N = 65 ml.
CH₃ COONa 0,1 N = 35 ml.

Les tubes 5 et 6 enfin sont des témoins fer, permettant de vérifier la courbe étalon.

L'examen des valeurs correspondant aux densités optiques obtenues permet de conclure que :

1) L'échantillon de pigment utilisé dans l'expérience (0,1 ml d'une solution à 2 % soit 2 mg) contenait 42,5 μg de fer. Nous avons vérifié auparavant (par l'oxine) qu'il ne contenait pas de fer à l'état libre.

2) Cet échantillon a d'autre part fixé 39,5 μg de fer, (ce qui représente un très fort degré d'insaturation).

3) On aboutit donc, par voie colorimétrique, à une teneur globale en fer de 42,5 + 39,5 + 82 μg de fer pour 2 mg de pigment, soit une teneur de 4,1 %.

Nos deux méthodes de dosage fournissent donc des résultats comparables. Ils permettent d'assigner au poids moléculaire de ce pigment, en fonction de sa teneur en fer, une valeur d'environ 1400 (en admettant une teneur de un atome de fer par molécule de pigment).

Le précurseur du pigment.

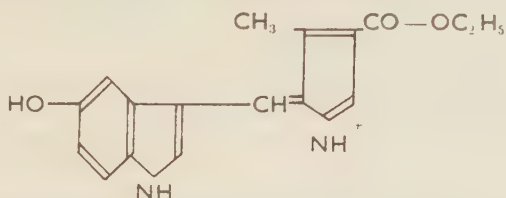
Le précurseur du pigment est une substance incolore de nature organique qui correspond à la substance libérée après élimination du fer par hydrolyse puis extraction par l'oxine.

Des travaux ont été déjà entrepris au Laboratoire, tendant à élucider la constitution des pigments microbiens produits par *B. roseus fluorescens* et *Ps. cattleyaeicolor*. C'est ainsi que MARCHAL et BENE [126] ont caractérisé la présence de groupements pyrroliques dans ces pigments. Nous nous sommes donc efforcés d'apporter des preuves supplémentaires de la présence effective de noyaux pyrroliques dans cette molécule.

Comme nous l'avons signalé, parmi les pigments bactériens à structure pyrrolique, deux sont connus : ce sont la prodigiosine et la violacéine.

La prodigiosine, est un tripyrrole substitué (WREDE) dont HUBBARD et RIMINGTON [81] ont réussi la biosynthèse (1950), et la violacéine est aussi considérée par TOBIE [195] comme dérivé pyrrolique.

Les conclusions de TOBIE avaient été mises en doute par WAELEDELE [204] qui faisait de la violacéine une quinone-imine de WILLSTAETTER. Mais un travail récent et très complet de BEER, JENNINGS and ROBERTSON [1954 - 17], assigne à ce pigment une structure indolopyrrolique. Ces chercheurs, en effet ont prouvé que l'acétylviolacéine, réduite par l'acide iodhydrique, donnait par oxydation un produit de formule :



qu'ils ont pu reproduire par synthèse.

Comme le pigment de *Ps. cattleyaeicolor*, elles donnent toutes deux une laque ou un produit pulvérulent ne manifestant aucune tendance à la cristallisation.

WILLIAMS, GREEN et RAPPOPORT [76 - 208] ont récemment constaté que le pigment produit par *Serratia marcescens* était en réalité composé de

plusieurs corps ; tous de structure trypprylméthénique mais de couleur et de poids moléculaire différents. Ils ont en outre retrouvé dans les cendres provenant de la calcination de ce pigment une certaine quantité de fer et de calcium dont ils n'ont d'ailleurs pas fait l'estimation quantitative.

Enfin, l'un de ces auteurs a décrit tout récemment [209] un pigment violacé hydrosoluble produit par un *Serratia* et dont les caractéristiques se rapprochaient assez de celles du pigment produit par *Ps. cattleya*ecolor.

Nous nous sommes servi pour l'étude de la structure de ce pigment de méthodes chimiques analytiques et de méthodes physiques (polarographie, spectro-photométrie).

b. — Etude chimique de la partie organique du pigment.

§ Méthodes chimiques

1. — Analyse élémentaire.

L'analyse élémentaire du pigment pur effectuée par des méthodes micro-analytiques* a donné les résultats suivants :

C : 41,29 %

H : 5,64 %

N : 9,60 %

O : 23,78 % (ce dernier chiffre est avancé sous toutes réserves, par suite de la présence de fer dans la molécule du pigment).

Le pigment ne contient en outre ni soufre ni phosphore.

2. — Caractérisation du noyau pyrrol :

Nous avons tout d'abord mis en évidence la présence de tels noyaux dans la molécule du pigment par 3 réactions colorées. Il nous a fallu auparavant dégrader ce pigment car aucune de ces réactions ne s'est montrée positive sur celui-ci utilisé tel quel. Ceci s'explique aisément car les réactifs utilisés se fixent soit sur l'azote, soit sur les carbones alpha ou bêta du pyrrol, qui doivent donc être libres. Or il n'en est certainement pas ainsi dans le pigment où les cycles présents sont liés entre eux et où les atomes d'azote doivent saturer tout ou partie des valences et coordinances du fer.

Pour libérer les noyaux pyrroliques du pigment, nous l'avons traité suivant la méthode employée par TOBIE pour libérer ceux présents dans la violacéine [195]. Elle consiste à mélanger intimement le pigment sec avec de la poudre de zinc. Ce mélange est alors introduit dans un tube étroit ; on recouvre d'un petit tampon d'amiante, étire l'extrémité ouverte et chauffe vivement le tube au bec Bunsen. Il se dégage alors après quelques minutes un liquide qui distille et vient se condenser dans la partie capillaire et froide du tube sous forme d'une huile jaune, peu soluble dans l'eau, mais soluble dans l'alcool et dans l'éther et à odeur caractéristique.

On récupère cette huile en séparant la partie capillaire dans laquelle elle s'est condensée et la dissout dans l'éther. Le témoin de réaction est effectué avec une solution de pyrrole à 1 %.

α — Réaction d'EHRlich :

On ajoute aux solutions où l'on recherche le pyrrole quelques gouttes d'une solution chlorhydrique de p. diméthylaminobenzaldéhyde. La positivité de la réaction se traduit par l'apparition d'une coloration rouge.

* Dosages effectués par le Service Central de Microanalyse du Centre National de la Recherche Scientifique à Paris.

β — On peut remplacer le p. diméthylaminobenzaldéhyde par la vanilline en solution chlorhydrique : on obtient dans ce cas une coloration orangée.

Ces deux réactions sont positives avec le pyrrole ou ses dérivés dont un au moins des carbones situés en β est libre. En effet, le groupement aldéhyde de chacun des deux réactifs réagit avec l'atome d'hydrogène d'un carbone β de 2 molécules de corps pyrrolique.

γ — Le pyrrole et ses dérivés dont le carbone situé en α est libre, peuvent former avec un diazoïque des corps colorés stables. On peut les préparer de la manière suivante : on utilise comme réactif l'acide p. aminophénylarsinique qui, diazoté, réagit avec le pyrrole pour donner un corps coloré en rose violacé et peu soluble en milieu d'acide ; il précipite alors sous forme d'une poudre amorphe de couleur brun-noir (réaction mise au point par MINGOIA) [141].

La préparation du diazoïque a lieu en ajoutant à une solution aqueuse chlorhydrique d'acide anilarsinique refroidie à 0° la quantité théorique de nitrite de sodium en solution également refroidie à 0° C. On mélange alors le diazoïque obtenu à une solution alcoolique de pyrrole préalablement neutralisée et froide. Il a y apparition d'une coloration pourpre intense. On précipite alors le produit formé par adjonction d'acide acétique, on filtre et sèche. La poudre obtenue se décompose vers 300° C sans fondre, il reste un globeule d'arsenic.

Ces trois réactions se sont montrées positives avec l'huile obtenue par traitement du pigment par le zinc à chaud.

Pour confirmer cette présence du pyrrole nous avons tenté d'obtenir quelques dérivés cristallisés à point de fusion net et de poids moléculaire relativement grand par rapport au pyrrole présent. Ces préparations sont indiquées dans le Traité de Chimie Organique de GRIGNARD (tableau XIX).

Nous avons opéré simultanément sur une solution témoin de pyrrole, d'indole et sur l'huile obtenue à partir du pigment et nous nous sommes tournés vers les deux dérivés suivants :

— Un dérivé à l'azote : le N-p. nitro-benzoylpyrrole obtenu par action du chlorure de p. nitrobenzoyl sur le pyrrole potassique en milieu éther de pétrole. Le pyrrole potassique est lui-même obtenu par l'action du potassium métal sur le pyrrole en solution dans l'éther de pétrole ou dans l'éther éthylique anhydre ; il y a dégagement d'hydrogène et formation d'une masse amorphe de pyrrole potassique insoluble.



Le N p. nitrobenzylpyrrole est un corps cristallin jaune, soluble dans les solvants organiques. Son point de fusion est 35° C.

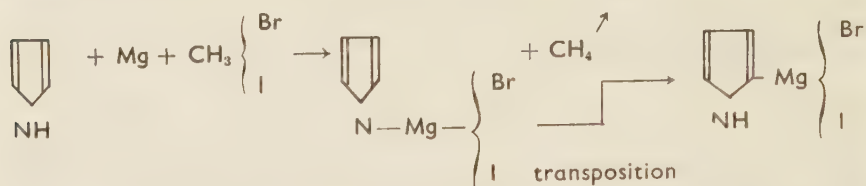
Nous avons réalisé de la même manière un N p. nitrobenzoylindole de point de fusion = 41° C.

Le produit de réduction du pigment enfin, traité dans les mêmes conditions a donné naissance à une substance de Tf. 36 - 37° C.

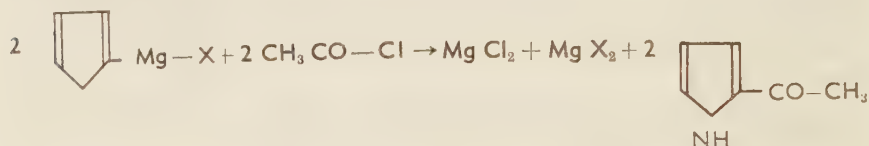
— Un dérivé sur un carbone en position α : le N-acétyl-pyrrole ou pyrrol-méthylcétone obtenue de la manière suivante :

Dans un premier temps, on prépare un magnésyl-pyrrole par la réaction classique de GRIGNARD : on fait tomber goutte à goutte dans un ballon contenant une solution de pyrrole dans l'éther anhydre et en présence de poudre

de magnésium, une solution étherée de bromure ou d'iodure de méthyle. Il y a formation d'un dérivé magnésien, d'une belle couleur verte en solution étherée, suivant la réaction :



Ce produit est très oxydable et polymérisable, aussi doit-on immédiatement le traiter dans un second temps à froid (dans la glace fondante) par une solution étherée de chlorure d'acétyle ajoutée par petites portions : on ajoute ensuite de l'eau et extrait la pyrrolyméthylcétone formée par l'éther. On purifie par entraînement à la vapeur d'eau et réextraction à l'éther (méthode de CIONGA) [37].



Ce corps cristallise en fines aiguilles blanches de Tf = 90° C. La β indolyl-méthylcétone obtenue dans les mêmes conditions fond à 189° C.

Nous avons alors réalisé la 2-4 dinitrophénylhydrazone de cette cétone, par action de la quantité théorique de 2-4 dinitrophénylhydrazine sur la cétone, en milieu éthero-alcoolique. L'hydrazone, peu soluble à froid dans ce mélange, cristallise. Son point de fusion instantané (car elle se décompose) mesuré au bloc MAQUENNE est de 322 - 324° C.

Nous n'avons pu obtenir de dinitrophénylhydrazone avec l'indolylméthylcétone. Le dérivé de réduction du pigment, traité ainsi, a donné naissance à un corps de Tf = 107 - 108° C, dont la 2-4 dinitrophénylhydrazone fondait elle-même vers 329° C.

Toutes les Tf sont portées dans le tableau XXX.

TABLEAU XXX

**COMPARAISON DES Tf DE DÉRIVÉS CRISTALLISÉS
DU PYRROLE, DE L'INDOLE ET DU PIGMENT
DE PSEUDOMONAS CATTLEAECOLOR**

Nature du dérivé	Pyrrole	Indole	Pigment
N — CO — C ₆ H ₄ — NO ₂	33° C	41° C	36 - 37° C
— CO — CH ₃	89 - 90° C	189° C	107 - 108° C
— C — CH ₃ DNP	322 - 324° C	—	329 - 332° C

3. — Recherche de groupements fonctionnels :

En raison des faibles quantités de pigment dont nous disposions, nous n'avons pu jusqu'à présent qu'effectuer des réactions qualitatives.

α — Groupements contenant de l'azote :

La grande solubilité du pigment dans l'eau et l'absence de coloration des solutions de précurseur incolore rendent peu probable la présence dans la molécule de groupements $—NO$ ou $—NO_2$.

L'existence du groupement fonctionnel amine a pu être caractérisée par la réaction au dithiocarbamate en opérant de la manière suivante : à 1 goutte de solution éthanolique de pigment on ajoute 11 gouttes de sulfure de carbone. Après 5 minutes de contact, l'excès de CS_2 est évaporé et l'on additionne le résidu de quelques gouttes d'une solution de nitrate d'argent dans l'acide nitrique dilué. La présence de groupements $—NH—$ ou $—NH_2$ se traduit par la formation d'un précipité noir de Ag_2S [56].

β — OH alcooliques :

Nous avons utilisé les deux réactions suivantes qui se sont toutes deux montrées négatives :

— **Réaction de DRAGGENDORF** [46] : A quelques mg de produit, on ajoute un peu de sulfure de carbone et de soude solide. On agite pendant 5 minutes et additionne d'une solution de molybdate d'ammonium à 1 %. Après acidification du mélange, on agite avec du chloroforme. Il y a coloration bleue de la couche chloroformique en présence de groupements alcooliques primaires ou secondaires.

— **Formation d'esters solides** : nous avons employé dans ce but le chlorure de p. nitrobenzoyle qui, réagissant sur les $—OH$ alcooliques donne naissance à l'ester p. nitrobenzoïque correspondant, généralement bien cristallisé. Nous avons obtenu dans ces conditions une laque rouge pourpre, incristallisable [méthode de HENSTOCK - 79 ; indiquée par STIG VEIBEL - 199].

γ — Groupement carbonyle.

La non réduction par le pigment, à froid comme à chaud, du réactif de TOLLENS, élimine la présence dans sa molécule de groupements aldéhydiques libres.

D'autre part, l'action sur une solution alcoolique de pigment, de la semicarbazide, et de la 2-4-dinitrophénylhydrazine, n'ont donné naissance à aucun dérivé cristallisé. Il ne semble donc pas exister de fonction cétone à l'intérieur du pigment.

δ — Fonction acide.

La présence de groupements $—COOH$ dans le pigment est suggérée par :

— Le point isoélectrique bas de celui-ci ($pH = 2,9$, valeur identique à celle de l'acide aspartique).

— Le pH de ses solutions aqueuses (3,5 en solution à 1 %) qui décomposent $NaCO_3H$ en CO_2 ; seuls les acides carboxyliques et sulfoniques sont capables de le faire (de même que quelques polynitrophénols, mais ceux-ci sont en général peu solubles et ont une couleur caractéristique).

Nous avons alors tenté de transformer le pigment en ester benzylique ou p.nitrobenzylique par l'action sur celui-ci des halogénures correspondants (chlorure ou bromure de benzyle et de p.nitrobenzyle).

On neutralise d'abord le pigment par la soude et l'on opère ensuite à chaud, en milieu alcoolique, sous réfrigérant à reflux, suivant la technique indiquée par KELLY et SEGURA [90]. (Durée de l'expérience : 6 heures.) Nous n'avons obtenu ainsi qu'une laque rouge groseille, incristallisable. Par hydrolyse alcaline à chaud (saponification) de la laque, on libère l'alcool phénylthylique, à odeur de rose.

§ Méthodes physiques

Les méthodes physiques utilisées sont au nombre de deux : la polarographie et la spectrophotométrie. Nous avons fait dans les deux cas des études comparatives avec certains composés pyrroliques naturels (prodigiosine, hématine, chlorophylle).

La prodigiosine a été extraite de corps bactériens de *Serratia marcescens* cultivés en fioles de ROUX sur gélose pomme de terre par l'acétone puis purifiée par dissolution dans le chloroforme.

L'hématine est un produit commercial (Roche).

La chlorophylle a été extraite (de feuilles d'ortie) et purifiée selon la méthode indiquée par WATTIEZ et STERNON [206].

I. — Polarographie.

Nous avons déjà vu l'utilité de cette méthode pour le dosage du fer contenu dans le pigment.

Mais l'étude du comportement du pigment ou de son précurseur incolore dans différents électrolytes de support nous a permis de constater que ce dernier donnait une vague polarographique dans les trois solutions suivantes, alors que le pigment proprement dit, saturé en fer, n'en donne absolument pas (nous avons d'ailleurs mis à profit cette propriété du « précurseur » pour estimer la saturation en fer des solutions de pigment).

Les trois solutions sont :

- l'oxalate de potassium 0,5 M
- le chlorure de potassium 0,1 M
- le mélange à parties égales d'ammoniaque et de chlorure d'ammonium 2 M.

Il faut noter ici que WUGGATZER et CHRISTIAN [1953 - 211] ont déjà utilisé une solution à PE. de $\text{NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$ 1,5 M pour le dosage polarographique de la chlorophylline. Ils obtenaient une valeur de potentiel de demi vague d'environ — 0,95 volt.

Nous avons donc polarographié des solutions aqueuses de précurseur obtenu par hydrolyse acide à chaud du pigment, d'hématine et de chlorophylle A traitées dans les mêmes conditions que la solution de pigment (il est nécessaire en ce qui concerne l'hématine, d'alcaliniser légèrement la solution après l'hydrolyse acide, car elle précipite en milieu acide). Les métaux (fer, magnésium) libérés par l'hydrolyse sont extraits par l'oxine et le chloroforme, suivant notre technique habituelle. Seule la prodigiosine a été utilisée en solution alcoolique (l'alcool ne gêne pas) sans hydrolyse préalable.

Nous avons polarographié 0,1 et 0,2 ml des solutions obtenues dans 5 ml des différents électrolytes de support ; les valeurs de potentiel de 1/2 vague des vagues obtenues sur les polarogrammes sont rassemblées dans le tableau XXXI.

TABLEAU XXXI
POTENTIELS DE 1/2 VAGUE DE COMPOSÉS PYRROLIQUES

Substances polarographiées	ELECTROLYTES DE SUPPORT		
	Oxalate K 0,5 M	KCl 0,1 M	$\left. \begin{matrix} \text{NH}_4\text{OH} \\ \text{NH}_4\text{Cl} \end{matrix} \right\} 2 \text{ M}$
Précurseur incolore du pigment de Ps. cattleyaeicolor	— 0,91 v.	— 0,65 v.	— 1,20 v.
Hématine privée de son fer	pas de vague	— 0,73 v.	— 1,15 v.
Chlorophylle A privée de son Mg	— 1,01 v.	pas de vague	— 1,22 v.
Prodigiosine	pas de vague		

Le pyrrole ne donne aucune vague dans ces conditions.

Le fer donne lui aussi des vagues dans ces 3 électrolytes dont les valeurs de potentiel de 1/2 vague sont respectivement de — 0,26, — 1,40 et — 1,73 v.

2. — Spectrophotométrie :

Le spectre a été réalisé entre 2.000 et 10.000 Å en cuves de quartz de 1 cm, avec une solution alcoolique de pigment (Fig. II) .Le spectre montre la présence de 3 maxima à 2.100 (A), 2.780 (B) et 5.600 (C) Å et de 2 minima à 2.600 et 4.250 Å. La coloration est plus intense en milieu acide qu'en milieu alcalin mais le spectre reste identique.

Les rapports entre les maxima sont constants :

(valeurs de D.O. 2.000 = 1,60 ; D.O. 2.780 = 0,96 ; D.O. 5.600 = 0,320)

$$\frac{B}{A} : 0,60 - \frac{C}{A} : 0,2 - \frac{B}{C} : 3.$$

Les coefficients d'absorption moléculaire ϵ à ces trois longueurs d'onde, rapportés à un poids moléculaire supposé de 1.400, sont respectivement de :

$$\epsilon \quad \left\{ \begin{array}{l} 2.100 = 34.300 \\ 2.780 = 20.700 \\ 5.600 = 6.860 \end{array} \right.$$

Nous avons aussi réalisé les spectres d'absorption de composés pyrroligues ; et avons trouvé des maxima d'absorption aux longueurs d'ondes suivantes (en Å) =

Chlorophylle : 2.150 - 2.800 - 4.600

Hématine : 2.100 - 2.750 - 5.540

Prodigiosine : 2.100 - 2.750 - 5.400 - Minima à 2.600 et 4.250

Pyrrole : 2.100 - 2.770 (faible).

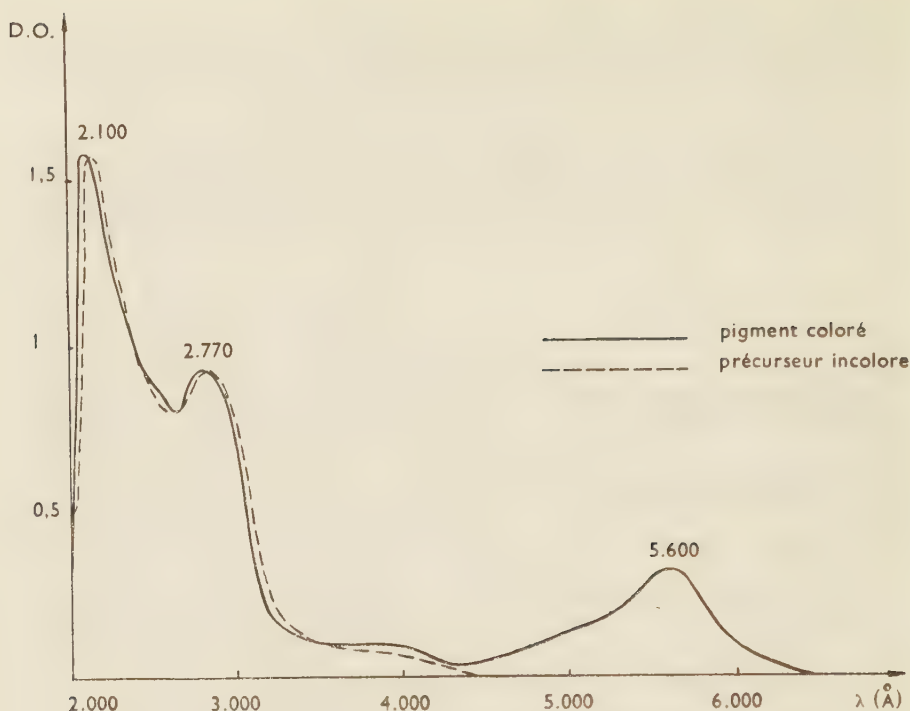


Fig. 11. — Spectres d'absorption du pigment de *Pseudomonas cattleyaecolor* et de son précurseur incolore

Nos résultats concernant la prodigiosine sont en accord avec ceux de HUBBARD et RIMINGTON [81] et de WILLIAMS et coll. [208] ; ces auteurs notent aussi les deux minima signalés à 2.600 et 4.250 Å. PICKETT, d'autre part [165] a déjà fait mention du pic d'absorption très intense du pyrrole à 2.100 Å dont le coefficient d'absorption moléculaire est à cette longueur d'onde d'environ 10.000.

Il est à signaler que le précurseur du pigment a un spectre identique à celui du pigment dans l'ultra-violet. Il n'absorbe pratiquement pas dans la partie visible du spectre mais l'adjonction de fer ferreux à une solution de précurseur incolore fait immédiatement réapparaître la coloration et le pic à 5.600 Å.

On constate donc une similitude frappante entre le spectre d'absorption du pigment de *Ps. cattleyaecolor* et du pyrrole ou de ses dérivés, en particulier dans l'UV.

c. — Discussion et conclusions.

L'étude critique et comparative des résultats obtenus par l'étude structurale du pigment de *Ps. cattleyaecolor* tant par des méthodes chimiques que physiques nous permet de conclure avec une certitude suffisante à la présence dans sa molécule de groupements pyrroliques ; examinons donc ces arguments :

1) Il a pu être réalisé plusieurs dérivés caractéristiques obtenus par des réactions assez spécifiques du noyau hétérocyclique pyrrolique simple ou substitué (Passage par le dérivé potassique ou par le magnésyl pyrrole). Ces réac-

tions sont effectuées après une dégradation du pigment (méthode de TOBIE), dont nous savions qu'elle avait déjà été appliquée sur un pigment de structure pyrrolique maintenant confirmée : la violacéine.

2) L'emploi de la méthode polarographique a permis de constater la présence de fer dans le pigment et l'on sait que les porphyrines, de structure pyrrolique, peuvent fixer des éléments métalliques. D'autre part, le précurseur du pigment est oxydo-réductible. Ceci est objectivé par l'apparition d'une « vague » polarographique ; nous avons en outre constaté que certains tétrapyrroles naturels (hématine, chlorophylle) qui sont aussi oxydoréductibles, donnaient après avoir perdu leur métal constitutif, dans les mêmes électrolytes, des vagues dont les caractéristiques de potentiel étaient en général à peu près équivalentes à celles du précurseur incolore de Ps. *cattleyaecolor*.

3) L'étude spectrophotométrique enfin montre une ressemblance remarquable dans l'allure des spectres du pigment de Ps. *cattleyaecolor*, des dérivés pyrroliques et du pyrrole lui-même. Dans tous les cas, le pic à 2.100 Å est très intense. Le maximum à 2.750 - 2.800 Å est plus faible avec le pyrrole que dans les spectres des autres composés ; ceci est dû à la présence effective chez hématine et chlorophylle probable dans le pigment de Ps. *cattleyaecolor*, de radicaux carbonyle (acide) ou aminés qui présentent une bande d'absorption dans cette zone de spectre. Enfin, remarquons que le maximum situé dans le visible (5.600 Å) est très voisin de celui de l'hématine (5.540 Å) qui contient aussi du fer.

Deux objections toutefois sont à faire, elles sont fondées sur des faits allant à l'encontre des propriétés normales des dérivés pyrroliques.

1) Le pyrrole et ses dérivés sont habituellement peu ou pas solubles dans l'eau mais solubles dans nombre de solvants organiques. Or, le pigment produit par Ps. *cattleyaecolor*, très soluble dans l'eau, est en général insoluble dans les solvants organiques, alcools exceptés.

2) Quand on arrache à des tétrapyrroles le métal qu'ils contiennent (fer, magnésium), ils restent cependant colorés. Or, le précurseur ne possède qu'une coloration jaune assez faible.

Sans vouloir minimiser ces faits, il convient de remarquer que le poids moléculaire du pigment est assez élevé (1.400) et que les groupements pyrroliques entrant dans sa constitution moléculaire peuvent être liés à des groupements ou radicaux hydrophiles. C'est le cas de la vitamine B₁₂ par exemple qui, outre son tétrapyrrole au cobalt, contient des radicaux phosphoriques et glucidiques hydrophiles. La valeur de son poids moléculaire est d'ailleurs du même ordre de grandeur, environ 1.500. D'autre part, l'arrachement de l'atome de fer peut provoquer un remaniement structural pouvant changer la coloration et en diminuer l'intensité. L'existence d'un tel remaniement est fortement suggéré par le fait suivant : le précurseur incolore (extrait d'une culture de Ps. *cattleyaecolor* en milieu sans fer ou préparé synthétiquement à partir du pigment) en solution perd peu à peu au cours du temps sa capacité de fixation du fer en même temps que sa coloration jaune s'intensifie.

6. — Propriétés et rôle.

a. — Oxydo-réductibilité :

Cette propriété du pigment a été déjà signalée au cours de ce travail mais, à la différence de la plupart des colorants, le pigment ne se décolore pas sous l'action des réducteurs ; l'intensité de la coloration est au contraire plus forte. Le même phénomène se passe dans le groupe des cytochromes, chez qui la forme réduite est plus colorée que la forme oxydée.

Pour mieux faire ressortir cette différence de coloration, nous avons eu recours à la méthode de « spectrophotométrie différentielle » suivant la technique

de SHIBATA, BENSON et CALVIN [1954 - 181] pour l'étude des cytochromes des suspensions bactériennes. Dans cette technique, la forme « oxydée » de la substance dont on veut faire le « spectre différentiel » est prise comme témoin. Les densités optiques de la forme « réduite » (par l'hydrosulfite) en fonction de la longueur d'onde correspondent donc directement à la différence de coloration entre les deux formes.

Aux longueurs d'onde où la forme oxydée a une absorption supérieure à celle de la forme réduite, cette dernière est alors prise comme témoin et la densité optique lue est reportée négativement sur le graphique.

Nous avons donc opéré ainsi sur une solution aqueuse de pigment. L'agent réducteur employé est l'hydrosulfite de sodium (quelques mg). Le spectre est réalisé entre 4.000 et 6.000 Å ; les pics d'absorption de la forme réduite se situent à (fig. 12) :

- 4.100 Å (correspondant au « Soret » des cytochromes)
- 4.900 » (faible)
- 5.100 »
- 5.600 »
- 5.990 »

au contraire, il y a un minimum très net à 5.700 Å où la forme oxydée absorbe plus que la forme réduite.

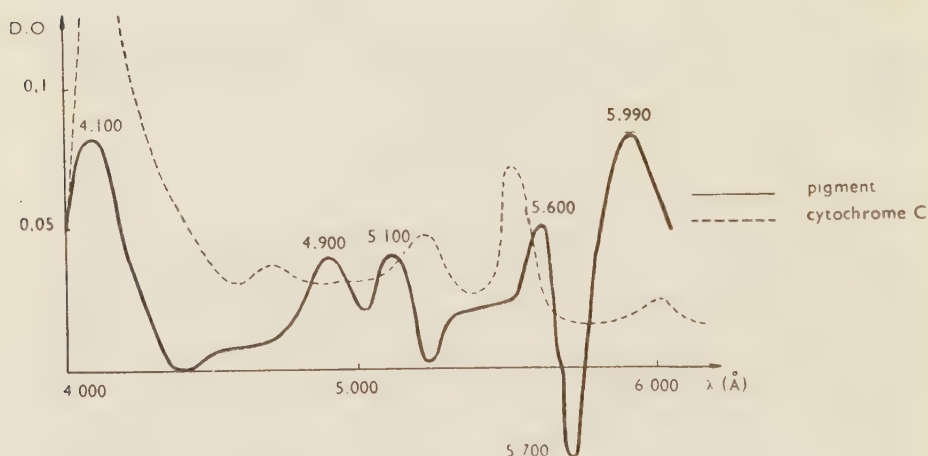


Fig. 12. — Spectres différentiels du pigment de *Pseudomonas cattleyaecolor* et du cytochrome C

Ce spectre différentiel correspond à celui donné par certains cytochromes : un spectre de cytochrome C commercial, réalisé dans les mêmes conditions nous a donné 4 pics à 4.120, 5.200, 5.520 et 5.900 Å.

C'est d'ailleurs grâce à cette technique que nous avons pu mener à bien la mesure du potentiel redox du pigment, en mesurant spectrophotométriquement à 5.600 Å le rapport forme oxydée/forme réduite, en fonction de la quantité de réducteur ajoutée (et en travaillant à pH constant).

b. — Agent chélateur :

Le précurseur du pigment complexe le fer ferreux et le fixe d'une manière telle qu'il n'est plus ionisable quand le pigment est mis en solution. Nous nous sommes donc proposé d'étudier l'action complexante de ce précurseur incolore vis-à-vis d'autres ions bivalents métalliques : Co, Cu, Mg, Ni et Zn en l'occurrence.

Ces ions sont utilisés sous forme de solutions aqueuses 0,01 M de leurs sulfates. Ces solutions ont été privées du fer qu'elles pouvaient contenir par traitement à l'oxine (technique de WARING et WERKMANN, déjà détaillée dans ce travail) en réalisant l'extraction à $\text{pH} = 3,5$. En effet, à ce pH l'oxinate de fer est quantitativement précipité et extractible par le chloroforme tandis qu'il n'y a pratiquement pas formation de complexes [oxine - Co, Cu, Mn, Ni et Zn]. Seule la solution de FeSO_4 n'a pas subi ce traitement.

Quant au précurseur incolore il est classiquement préparé par hydrolyse acide à chaud d'une solution aqueuse de pigment de Ps. cattleyaecolor (0,2 ml H_2SO_4 N pour 5 ml de solution de pigment). Le fer libéré est immédiatement extrait à l'oxine et au chloroforme dans les mêmes conditions. La solution obtenue est légèrement colorée en jaune.

La fixation des ions métalliques sur ce produit incolore est suivie par polarographie, de 2 manières :

— Soit en appréciant la diminution de la vague donnée par le précurseur incolore en oxalate de potassium 0,5 M ; vague qui, rappelons-le, n'est pas donnée par le pigment saturé en fer.

— Soit en calculant le métal fixé par le précurseur incolore du pigment. Il est possible de le faire en mesurant :

1. — La longueur de la vague polarographique donnée par un apport constant (1 μ Mol.) de l'ion métallique considéré, dans un électrolyte de support convenable (mélange à parties égales de NH_4OH 2 M et de NH_4Cl 2 M).

2. — La longueur de la vague donnée dans le même électrolyte par le mélange à la μ Mol. de métal d'un volume connu de la solution de précurseur incolore de pigment.

La différence entre la longueur des deux vagues donne très simplement la quantité du métal fixé.

L'annulation de la vague du précurseur incolore par le fer et le nombre de μ Mol. de fer fixées par un volume déterminé de solution de celui-ci servent de références. Nous avons également tenté d'apprécier la stabilité des complexes formés en essayant de les déplacer par le fer ferreux.

1. — Polarographie du précurseur incolore du pigment :

Elle est réalisée en solution 0,5 M d'oxalate de potassium privée du fer qu'elle contient à l'état d'impureté par l'oxine. Le précurseur incolore y donne une vague dont le potentiel de demi-vague est d'environ — 0,90 volt (voir fig. 10, p. III).

Les mélanges à polarographier sont préparés en introduisant dans une série de tubes :

— 0,2 ml de solution du précurseur incolore.

— 0,2 ml de solution 0,01 M des différents ions métalliques utilisés.

Un témoin est réalisé en remplaçant les solutions métalliques par 0,2 ml d'eau. Après repos de 1/4 d'heure, 0,2 ml des mélanges sont introduits dans la cellule du polarographe avec 5 ml d'oxalate K 0,5 M*. On opère sous atmosphère d'azote.

Les polarogrammes obtenus montrent une disparition totale de la vague donnée par le précurseur incolore en présence de fer, cuivre et nickel.

Le manganèse et le zinc diminuent faiblement la longueur de cette vague : dans nos expériences, la longueur de la vague qui était de 38 mm pour la solution témoin, n'est plus que de 30 mm en présence de ces différents métaux.

Le cobalt la diminue d'une manière plus importante : 23 mm au lieu de 38.

On constate donc bien que la fixation des ions métalliques par le précurseur incolore n'est pas identique pour tous ; il est aussi possible que la liaison formée soit plus ou moins labile. C'est ce que nous avons vérifié en ajoutant aux complexes formés une quantité égale d'ion ferreux, en réalisant les mélanges suivants :

- 0,2 ml de solution de précurseur incolore,
- 0,2 ml de solution 0,01 M d'ions métalliques,
(ou 0,2 ml d'eau pour le témoin.)

On laisse en repos pendant 1/4 d'heure. On constate alors dans les tubes les colorations suivantes : nulles, chez le témoin et en présence de Co, Mn et Zn, il y a légère coloration jaune en présence de Cu et Ni.

On ajoute alors à tous ces tubes 0,2 ml de solution 0,01 M de FeSO_4 , on laisse reposer 30 minutes. On note alors l'apparition de la couleur violette caractéristique du pigment dans les tubes contenant Mn et Zn, et aucune modification de couleur dans ceux contenant Co, Cu, ou Ni. Le fer a donc incontestablement déplacé Mn et Zn du complexe. L'apparition de la coloration en présence de Mn et surtout Zn demande toutefois un certain temps (20 minutes).

On réalise alors la polarographie de 0,3 ml des mélanges en oxalate. Les courbes obtenues permettent de conclure que :

1) Le fer n'a absolument aucune action sur les complexes formés avec Cu ou Ni. Les courbes sont identiques, avec ou sans fer.

2) Le fer déplace largement Mn et Zn de leurs complexes, cependant il n'y a pas fixation totale du fer car la vague du précurseur incolore ne disparaît pas totalement. Les longueurs de vagues sont respectivement de 9 mm en présence de Mn et 17 mm en présence de Zn, contre 38 mm pour le témoin (et 0 mm en présence de fer). Le déplacement du métal n'est donc pas instantané, ce qui explique qu'il est nécessaire d'attendre un certain temps pour assister à l'apparition de l'intensité maxima de coloration dans les mélanges $[\text{Zn (ou Mn)} + \text{Fe}^{++}]$.

3) Le cobalt enfin donne un polarogramme curieux : nous venons de voir que cet ion se fixait légèrement sur le précurseur incolore (longueur de vague : 30 mm au lieu de 38). Or l'adjonction de fer redonne une vague de longueur identique à celle du témoin (38 mm). Le fer a donc déplacé le cobalt fixé, mais de son côté, celui-ci empêche la fixation du fer sur le précurseur car la solution reste incolore.

* Constantes de l'appareil :

Multiplicateur de tension : 1 v.

Amortissement (damping) : 4.

Réduction de sensibilité : 1×20 .

Sensibilité de l'amplificateur : 50.

Compensation du courant de diffusion : 3.

2. — Polarographie des ions métalliques :

Elle permet d'apprécier la stabilité des complexes formés car seule la forme ionisée du métal est dosable.

Nous avons choisi un électrolyte de support (mélange à parties égales de NH_4OH 2 M et de NH_4Cl 2 M) [138] dans lequel tous les métaux utilisés dans notre étude donnent des vagues suffisamment nettes et séparées les unes des autres. Les valeurs de potentiels de demi-vague de ces ions, sont, par ordre croissant de :

- 0,62 v. pour le Cu
- 1,19 v. — Ni
- 1,47 v. — Co
- 1,62 v. — Zn
- 1,73 v. — Fe^*
- 1,78 v. — Mn.

Le précurseur incolore donne une petite vague vers — 1,20 v. qui est voisine de celle du nickel mais il se trouve heureusement comme on l'a vu, que le nickel en se combinant au précurseur incolore en annihile la vague. Le pigment lui, ne donne aucune vague entre 0 et — 2 volts.

Pour chaque métal, nous réalisons des séries de 3 tubes dont la constitution est la suivante :

1 — **Métal seul** : 0,2 ml solution 0,01 M ion métallique et 0,2 ml d'eau.
On polarographie 0,2 ml de ces solutions.

2 — **Métal + précurseur incolore** :
0,2 ml solution 0,01 M d'ion métallique
0,2 ml solution précurseur

On polarographie 0,2 ml du mélange, après au moins 15 minutes de contact.

3 — **Métal + précurseur incolore + fer** :
0,2 ml solution 0,01 M d'ion métallique
0,2 ml solution précurseur

Laisser au repos 15 minutes puis ajouter :
0,2 ml solution 0,01 M Fe^{++} .

On polarographie 0,3 ml du mélange, après 30 minutes de contact.

Chaque prise d'essai correspond donc à 1 μ Mol. de métal et 0,1 ml de solution de précurseur incolore. Elle est introduite dans 5 ml d'électrolyte de support, sous azote sans oxygène**.

Les longueurs des vagues obtenues sur les polarogrammes des mélanges

* L'étude de la fixation du fer a été faite en oxalate K 0,5 M où la vague donnée par cet élément est beaucoup plus sensible que dans l'électrolyte ci-dessus. Nous avons calculé que 0,1 ml de la solution de précurseur incolore utilisée dans toutes ces expériences pouvait fixer 0,48 μ Mol. Fe^{++} . Le fer donne toutefois une vague dans le mélange $\text{NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$ mais peu importante (17 mm pour 1 μ Mol.) et pouvant interférer avec celle du manganèse en raison de la hauteur de son potentiel de demi-vague, égal à — 1,73 v. (Mn — 1,78 v.).

** Constantes de l'appareil :
Multiplicateur de tension : 1 v.
Amortissement (damping) : 4.
Réduction de sensibilité : 1×100 .
Sensibilité de l'amplificateur : 80.
Compensation du courant de diffusion : 1.

(1), (2) et (3) effectués avec chaque métal et la quantité (en μ Mol.) correspondante de chaque ion restant à l'état libre sont consignées dans le tableau XXXII.

TABLEAU XXXII

**ASPECT QUANTITATIF
DE LA FIXATION DE MÉTAUX PAR LE PRÉCURSEUR INCOLORE
DE PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR**

Métaux	Longueur des vagues (mm)			μ Mol. métal ionisé présent		
	Métal seul	Métal + précurseur	Métal + précurseur + Fe	Métal seul	Métal + précurseur	Métal + précurseur + Fe
Co	79	55	64	1	0,70	0,81
Cu	25	20	20	1	0,80	0,80
Fe (oxalate K)	92	48	—	1	0,52	—
Mn	30	non mesurables (vagues peu nettes)		1	—	—
Ni	44	26	26	1	0,56	0,56
Zn	55	non mesurables (vagues peu nettes)		1	—	—

On peut donc tirer des chiffres de ce tableau les conclusions suivantes :

— Seuls Ni (0,44 μ Mol. fixées) et Fe (0,48 μ Mol. fixées) saturent complètement le précurseur incolore. L'union est stable et les deux métaux ne sont déplaçables de leur complexe par aucun autre métal. La seule différence réside dans le fait que le fer donne un pigment très coloré, tandis que le nickel ne produit qu'un corps jaune verdâtre de pouvoir colorant bien moins intense.

— Le cuivre et le cobalt ne saturent pas totalement le précurseur incolore (0,2 μ Mol. fixées environ, contre 0,45 pour Fe et Ni), ils donnent cependant un complexe stable, non déplaçable par le fer.

— On ne peut tirer aucune conclusion sûre concernant Mn et Zn en raison du peu de netteté de la plupart des vagues obtenues. Il ne semble cependant y avoir aucune fixation sur le précurseur incolore car les vagues obtenues en (2) et (3) ne sont sûrement pas inférieures aux vagues témoins (1). S'il y a fixation, celle-ci est donc très labile, puisque le métal se trouve à l'état ionisé quand le complexe est en solution et qu'il est très facilement déplaçable par le fer.

c. — Rôle dans la vie des bactéries :

Les trois propriétés de ce pigment susceptibles d'intervenir utilement dans la vie de *Ps. cattleyaecolor* sont :

- La présence de fer dans sa molécule
- Son oxydo-réductibilité
- Le pouvoir de son précurseur incolore de « chélater » certains ions métalliques.

Voyons dans quelles conditions ces propriétés peuvent influencer la croissance normale de *Ps. cattleyaecolor*.

1. — Oxydo-réductibilité :

Bien que le pigment de *Ps. cattleyaecolor* soit oxydo-réductible, il ne semble jouer qu'un rôle tout à fait accessoire dans la respiration de ce germe. Ce n'est donc pas à proprement parler un pigment respiratoire. De plus, il n'est produit que dans certains milieux, de composition bien déterminée, bien que *Ps. cattleyaecolor* soit un germe peu exigeant sur ses sources nutritives et qu'il croisse très bien sur de nombreux milieux. Sa croissance s'effectue aussi bien sur milieu synthétique sans apport de fer, la quantité du métal nécessaire à la synthèse des enzymes respiratoires (cytochromes) étant fournie par le fer présent à l'état d'impureté dans certains constituants du milieu. En anaérobiose même, et en présence d'un accepteur final d'hydrogène convenable, le nitrate, la production de pigment n'augmente pas et il est probable là encore que le système cytochromique joue un rôle actif. En effet, les corps bactériens provenant de culture anaérobie en présence de nitrate présentent une coloration rose nettement plus intense que celle de bactéries cultivées dans le même milieu, mais en aérobiose. Ces observations rejoignent celles faites par SATO [1956 - 177] sur deux espèces réduisant le nitrate : *Ps. dénitrificans* et une souche d'*Escherichia coli* ; ici aussi la teneur des cellules en cytochromes est 3 à 4 fois plus élevée lorsqu'elles sont cultivées en anaérobiose.

D'ailleurs la grande majorité des pigments respiratoires est intracellulaire, or le pigment de *Ps. cattleyaecolor* diffuse des corps bactériens dans le milieu.

Le rôle respiratoire possible de ce pigment est donc minime, sinon nul, du moins dans des conditions de vie normales.

2. — Présence de fer.

Nous avons vu que le pigment de *Ps. cattleyaecolor* contenait du fer (4 %) et qu'il était facile de libérer celui-ci par des méthodes chimiques. Il est donc fort possible que cet élément soit aussi séparé de la molécule du pigment par voie biochimique. Nombre de bactéries, *Ps. cattleyaecolor* en particulier, sont capables de libérer un métal inclus dans certains « chélates » : si on cultive le germe dans un milieu synthétique L_1 où l'on a ajouté de l'acide éthylène-diaminotétracétique (EDTA) qui complexe le fer présent, on constate pourtant une croissance et une chromogénèse normales ; il y a donc bien eu décomposition par la bactérie du complexe [EDTA - Fe].

Nous avons étudié par biophotométrie la croissance de *Ps. cattleyaecolor* en milieu L_1 absolument privé de fer (traitement par l'oxine) où étaient ajoutées des quantités croissantes de pigment. Nous avons constaté qu'il y avait proportionnalité entre l'intensité de la croissance et la quantité de pigment ajouté, le témoin sans pigment ne montrant aucune croissance. On note en même temps une décoloration des milieux, traduisant bien la dissociation du pigment en fer, utilisé, et précurseur incolore.

Le précurseur incolore lui-même possède une action favorisante sur la croissance : la phase de latence est en effet plus courte chez les germes cultivés en milieu privé de fer additionné soit de pigment soit de précurseur et de fer, que chez ceux croissant en milieu où il a seulement été introduit du fer. Cette action favorisante a d'ailleurs déjà été signalée par J.G. MARCHAL et F. LOTZ [130], chez *Phycomyces blakesleeana*, organisme nécessitant la présence de vitamine B₁ pour sa croissance, où le pigment s'est montré doué d'une action renforçatrice de la vitamine B₁.

Les mêmes expériences ont été reprises en tubes de milieu L₁ sans fer où il était ajouté soit :

- du pigment
- du précurseur incolore saturé par la quantité aliquote de fer ferreux
- du fer ferreux seul.

Dans ces conditions, nous avons observé la croissance de deux espèces bactériennes : *Ps. cattleyaecolor* et *Ps. aeruginosa*. Dans tous les cas, le développement et la chromogénèse ont été plus rapides et plus intenses dans les seuls tubes ayant reçu le pigment ou le précurseur incolore saturé par le fer, le pigment étant constamment décoloré.

Ces expériences permettent donc d'affirmer le rôle probable de « réservoir » de fer joué par le pigment ; elles suggèrent aussi l'influence favorisante du précurseur incolore sur la croissance.

La présence de composés extracellulaires liés au fer et doués de propriétés complexantes à l'égard de ce métal a déjà été observée par Ph. LASSEUR* qui en 1913, avait remarqué que les bactéries du groupe *subtilis*, *mesentericus*, *megatherium*, cultivées en milieu L₁ « donnent des cultures colorées en rouge, violet ou bleu, suivant la forme expérimentée. Par contre, si l'on cultive ces micro-organismes en milieu L₁ privé de fer, on n'observe aucune coloration. »

On sait aussi (travaux d'EMMERLING et ABDERHALDEN - 1903, de BEIJERINCK) que certaines bactéries sont capables de produire des acides phénoliques, tels l'acide protocatéchique ou l'acide quinique, donnant avec le fer des dérivés colorés.

Plus récemment (1955) GARIBALDI et NEILANDS [69] ont constaté qu'en présence de quantités convenables de fer ajoutées à des milieux rigoureusement privés de cet élément, certaines bactéries (*Bacillus megatherium* et *subtilis*) étaient capables de produire des pigments colorés (vert ou pourpre) de nature chimique non encore élucidée, auxquels ces auteurs attribuent une structure polyhydroxyphénolique, et contenant du fer. Ils considèrent que ces substances sont probablement synthétisées en vue d'une chélation du métal, suivie éventuellement d'une libération de celui-ci en fonction des besoins, lorsqu'il vient à manquer dans le milieu. Ces composés sont aussi oxydoréductibles.

Le pigment de *Ps. cattleyaecolor* peut donc très bien jouer un tel rôle.

c. — Propriétés complexantes du précurseur incolore :

Nous avons vu que le précurseur incolore peut fixer d'une manière plus ou moins stable, des ions métalliques bivalents. Or, certains de ceux-ci (Cd ou Cu, etc...) sont toxiques et empêchent la croissance bactérienne. En raison de ces propriétés complexantes, le précurseur doit donc pouvoir jouer un rôle protecteur sur la croissance de bactéries cultivées en milieu contenant de tels ions.

* Observations sur le pouvoir chromogène de quelques Bactéries. Recueil publié à l'occasion du Jubilé Scientifique du Professeur MONNIER (1913).

Nous avons suivi l'étude de ce pouvoir protecteur par voie biophotométrique et plus simplement par l'appréciation visuelle de la croissance en fonction du temps. Nous cultivons dans tous les cas le germe sur milieu L_1 normal, privé de son précipité pour les expériences biophotométriques.

Les ions métalliques utilisés ont été Cd, Cu, Mn, Ni et Zn ajoutés dans le milieu à la concentration finale de 4×10^{-5} (concentration normale du fer dans le milieu L_1) les bactéries employées étant *Ps. cattleyaecolor* et *Ps. aeruginosa*. A cette concentration Mn et Zn sont sans action sur la croissance, mais Ni, Co et surtout Cu et Cd la gênent considérablement.

Dans les milieux contenant les ions toxiques, on a constaté un pouvoir protecteur total du précurseur incolore en présence de nickel, où la croissance a été identique en rapidité et en intensité à celle du milieu témoin, partiel en présence de Co et de Cu, mais nul en présence de cadmium. Les résultats de ces expériences confirment bien les conclusions que nous avons apportées à la fin de l'étude polarographique de la chélation de métaux par le précurseur incolore du pigment de *Ps. cattleyaecolor* et qui étaient les suivantes :

- Formation quantitative d'un chélate stable avec Ni.
- Formation partielle de chélate avec Co et Cu où une partie du métal restait à l'état ionisé.
- Le Cd, comme Mn et Zn ne se fixant pas, ou d'une manière très labile sur le précurseur.

RÉSUMÉ

ET

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Au cours de cet exposé nous avons tenté d'élucider et de préciser certains aspects du métabolisme azoté et carboné et de la chromogénèse de *Ps. cattleyaecolor*. Nos recherches peuvent se résumer de la manière suivante :

Après une première partie dans laquelle nous avons passé en revue les méthodes physiques, chimiques et physico-chimiques qui nous ont permis de mener à bien la partie expérimentale de notre travail, nous avons dans une seconde partie envisagé :

I. — LE MÉTABOLISME DE L'AZOTE PAR *PSEUDOMONAS CATTLEYAECOLOR*

en étudiant :

A. — L'utilisation et le sort des formes minérales de cet élément.

Nous avons pu tirer les conclusions suivantes :

1° En présence de substrats carbonés convenables, *Ps. cattleyaecolor* est capable d'utiliser pour sa croissance l'azote sous deux formes minérales : nitrique et ammoniacale.

2° La forme nitrique est transformée par une série de réductions successives en ammoniacque, stade minéral final de l'azote, avant le passage sous forme organique.

Nous avons envisagé les réactions conduisant à ces stades successifs à, savoir :

— La réduction stoechiométrique du nitrate en nitrite grâce à l'intervention d'une nitrate-réductase que nous avons isolée. Nous avons vérifié les conditions d'action de cette nitrate-réductase et la nécessité de la présence de molybdène (action d'inhibiteurs spécifiques, NaN_3 en particulier).

— Les deux modalités possibles d'évolution du nitrite formé : réduction soit en azote moléculaire gazeux et en oxydes d'azote, soit en ammoniacque. Cette réduction en ammoniacque est directe, sans le passage intermédiaire par le stade hydroxylamine, de règle chez d'autres organismes vivants. *Ps. cattleyaecolor* est cependant capable de réduire stoechiométriquement l'hydroxylamine en ammoniacque.

Cette suite de réductions est ce que nous appellerons la voie « assimilative » du nitrate par opposition à la « nitrate respiration ». En effet, *Ps. cattleyaecolor* est capable de croître en anaérobiose stricte en présence du nitrate alors qu'il ne peut absolument pas le faire avec une autre source d'azote, quelle que soit celle-ci. Le nitrate fonctionne alors dans ces conditions non seulement comme source d'azote mais encore comme accepteur final de l'hydrogène provenant des déshydrogénations des substrats. Il permet donc la respiration et les oxydations cellulaires de *Ps. cattleyaecolor* en l'absence d'oxygène gazeux.

3° L'utilisation de l'ammoniaque et l'évolution vers les formes organiques de l'azote : l'ammoniaque, amenée telle quelle dans le milieu, ou provenant de la réduction du nitrate, est transformée en azote organique, amino-acides en l'occurrence, par union avec les céto-acides (acide pyruvique, α -cétoglutarique). Des monoaminodiacides ainsi formés dérivent les autres acides aminés par le processus de transamination. L'identification chromatographique des amino-acides élaborés par *Ps. cattleyaecolor* cultivé en présence de nitrate ou (et) d'ammoniaque confirme cette hypothèse.

B. — L'utilisation de l'azote organique.

Plusieurs groupes de substances ont été étudiés :

1° Les amino-acides : nous avons tout d'abord vu que *Ps. cattleyaecolor* était capable de se développer en présence de divers acides aminés fournissant à la fois le carbone et l'azote nécessaires.

Etudiant ensuite plus particulièrement le sort de l'azote contenu dans ces acides, nous avons constaté que le processus de désamination oxydante était la principale voie métabolique utilisée. Nous avons d'ailleurs pu, dans la plupart des cas, suivre le sort des produits formés (céto-acides). L'emploi d'inhibiteurs a confirmé ces résultats. D'autres types de réactions peuvent transformer toutefois certains amino-acides tels que l'histidine (ouverture du cycle avec production d'acide glutamique), l'arginine (transformation finale en acide γ -aminobutyrique, gaz carbonique et ammoniaque) et l'acide glutamique qui peut être transformé en acide γ -aminobutyrique par décarboxylation.

Nous nous sommes enfin arrêté à un processus très important concernant l'élaboration d'acides aminés nouveaux par les êtres vivants. Nous avons signalé l'existence et l'importance dans la genèse des amino-acides de ce processus de transamination.

2° Autres corps organiques azotés : parmi tous les corps essayés, deux ont retenu plus particulièrement notre attention. Ce sont : l'asparagine et l'urée ; nous avons vu que ces deux substances étaient hydrolysables par *Ps. cattleyaecolor* et nous avons caractérisé les enzymes correspondants, nécessaires à cette transformation : une asparaginase et une uréase.

Le métabolisme de l'azote étant ainsi précisé, nous avons abordé :

II. — LE MÉTABOLISME CARBONÉ DE *PS. CATTLEYAECOLOR*

Ps. cattleyaecolor ne peut utiliser pour sa croissance que des sources organiques de carbone. C'est pourquoi, ayant étudié déjà précédemment son pouvoir d'utilisation des glucides, nous sommes-nous arrêtés à l'appréciation de l'influence sur sa croissance de certains acides organiques dont le rôle en biochimie est maintenant largement connu. La méthode biophotométrique nous a permis de mener à bien cette étude.

Nous avons ensuite abordé le processus de respiration et le métabolisme oxydatif de *Ps. cattleyaecolor* en présence de ces différents acides : la consommation d'oxygène, l'identification des corps résultant de cette oxydation, l'emploi de plusieurs inhibiteurs d'action différente, nous ont permis de préciser les modalités d'utilisation et le sort de ces acides.

Nous avons ainsi constaté que :

- L' α -cétooglutarate est décarboxylé en acide succinique.
- Le citrate est oxydé puis transformé en α -cétooglutarate.
- Le fumarate est hydraté en malate.
- Le lactate est déshydrogéné en pyruvate.
- Le malate est oxydé en oxalacétate, lui-même décomposé en pyruvate.
- Le pyruvate est simultanément :
 - décarboxylé en acétate,
 - et surtout transformé en acétoïne.
- Le succinate est déshydrogéné en fumarate (lui-même transformé en malate).

Il nous a semblé aussi utile de rechercher la présence de déshydrogénases chez cette bactérie ; *Ps. cattleyaecolor* possède des déshydrogénases très actives vis-à-vis de la glycérine, du lactate et du succinate, mais d'action beaucoup plus faible à l'égard du pyruvate, du citrate et du malate.

Nous nous sommes enfin proposé la recherche et l'identification des acides organiques libres élaborés par *Ps. cattleyaecolor* cultivé en présence d'azote minéral (NH_4NO_3) et de sources de carbone variées. Nous avons ainsi retrouvé :

- Le citrate en présence d' α -cétooglutarate et inversement,
- l' α -cétooglutarate en présence de citrate.
- Les acides malique et pyruvique avec le fumarate.
- L'acide pyruvique et un peu d'acide acétique avec le lactate.
- Les acides pyruvique et α -cétooglutarique avec le malate.
- Les acides succinique et acétique avec le pyruvate.
- Les acides malique, acétique et α -cétooglutarique avec le succinate.

L'examen critique de tous les faits et des résultats obtenus nous ont amené à conclure que la dégradation des glucides passait par le stade acide pyruvique et qu'à partir de ce corps, véritable plaque tournante du métabolisme du carbone, on se trouve en présence de trois voies possibles. Deux ont pour point de départ l'acétate, provenant de la décarboxylation du pyruvate : l'une est le cycle tricarboxylique classique de KREBS mais l'identification d'acide succinique obtenu par l'action de bactéries non proliférantes en présence d'acétate, implique aussi la participation d'un cycle plus court, type cycle dicarboxylique de SZENT-GYORGYI. La troisième est la transformation de l'acide pyruvique en acétoïne.

Dans une troisième et dernière partie enfin, nous nous sommes intéressés à un aspect très particulier de la biologie de *Ps. cattleyaecolor* : sa chromogénèse.

Après une étude des facteurs tant physiques que chimiques qui conditionnent la production du pigment violet cobalt caractéristique de cette espèce, nous nous sommes attachés à l'étude du pigment proprement dit.

Nous avons alors successivement passé en revue :

1° Les conditions optimales d'obtention du pigment, son extraction et sa purification. Cette dernière est en effet longue et assez délicate, nous avons dû la suivre d'une manière précise.

2° Son étude chimique : nous avons caractérisé dans la molécule du pigment la présence constante de l'ion ferreux, nécessaire à la coloration. Nous avons pu ensuite prouver d'une façon à peu près indiscutable, l'existence dans la fraction organique de cette molécule de groupements pyrroliques, ceci par des méthodes chimiques analytiques et par une étude comparative avec d'autres dérivés pyrroliques, en ayant recours à la polarographie et à la spectrophotométrie.

Les propriétés et constantes physiques de ce pigment ont été les suivantes :

— Il est soluble dans l'eau et les alcools inférieurs, insoluble dans les solvants organiques.

— Il forme à sec une laque incristallisable qui est très hygroscopique.

— Il est acide comme le fait prévoir la valeur de son point isoélectrique ($\text{pH} = 2,9$).

— Il possède enfin un spectre d'absorption caractéristique avec trois maxima à 2.100, 2.780 et 5.600 Å.

3° Nous avons enfin tenté d'éclaircir le rôle du pigment dans la vie de la bactérie, à la lumière de certaines de ces propriétés physiques (oxydo-réductibilité) et chimiques (présence de fer, effet chélateur de la partie organique).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ABELSON (P.H.), *J. Biol. Chem.* 1954, **206**, 335.
- [2] ACHER (R.), CROCKER (C.), *Bioch. Bioph. Acta.* 1952, **9**, 704.
- [3] ACHER (R.), FROMAGEOT (C.), JUTICZ (M.), *Bioch. Bioph. Acta.* 1950, **5**, 81.
- [4] ADAMS (R.A.), Thèse Doctorat ès Sciences, Nancy. 1955.
- [5] AJL (J.J.), *J. of Bact.* 1950, **59**, 499.
- [6] AJL (J.J.), *Bact. Rev.* 1951, **15**, 211.
- [7] AJL (J.J.), *J. Gen. Phys.* 1951, **34**, 785.
- [8] AJL (J.J.), KAMEN (M.D.), *Feder. Proc.* 1950, **9**, 143.
- [9] AJL (J.J.), KAMEN (M.D.), RANSON (L.S.), WONG (D.T.O.), *J. Biol. Chem.* 1951, **184**, 849 et 859.
- [10] AUBEL (E.), *C.R. Soc. Biol.* 1938, **128**, 45.
- [11] AUBEL (E.), ROSENBERG (A.), SZULMAJSTER (J.), *Bioch. Bioph. Acta.* 1950, **5**, 228 et 255.
- [12] AWAPARA (J.), SEALE (B.), *J. Biol. Chem.* 1952, **194**, 497.
- [13] AZOULAY (E.), SENEZ (J.C.), *C.R. Ac. Sc.* 1958, **247**, 1251.
- [14] BARKER (M.A.), TAHA (S.M.), *J. of Bact.* 1942, **43**, 347.
- [15] BARRET (J.T.), KALLIO (R.E.), *J. of Bact.* 1953, **66**, 517.
- [16] BATELLI et STERN, *J. Phys. et Path. Gén.* 1907, **9**, 228.
- [17] BEER (B.E.), JENNINGS (B.E.), ROBERTSON (A.), *J. Chem. Soc.* 1954, **3**, 2679.
- [18] BENTLEY (M.R.), WHITEHEAD (J.K.), *Bioch. J.* 1950, **46**, 341.
- [19] BLAISE et GAULT, *C.R. Ac. Sc.* 1908, **147**, 199.
Bull. Soc. Chimie 1911, **9**, 455.
- [20] BLOM (M.), *Bioch. Ztschr.* 1928, **194**, 392.
- [21] BOREI (M.), *Bioch. Ztschr.* 1942, **312**, 160.
- [22] BOULANGER (P.), BISERTE (G.), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1951, **33**, 1930.
- [23] BOUSSARD (M.), *Bull. Ass. Dipl. Micr. Fac. Pharm. Nancy*, 1958, **70**, 4.
- [24] BRADY (O.L.), *J. Chem. Soc.* 1931, 756.
- [25] BREZINA (M.), ZUMAN (P.), *Die Polarographie in der Medizin, Biochimie und Pharmacie.* Geest und Portig K.G. éd. Leipzig. 1956.
- [26] BRISOU (J.), Thèse Doctorat ès Sciences, Bordeaux. 1958.
- [27] BRYANT (F.), OVERELL (B.T.), *Bioch. Bioph. Acta.* 1953, **10**, 471.
- [28] BURRIS (R.M.), *In Umbreit et al : Manometric Technics and Tissue Metabolism.* Burgess Publ. édit. Minneapolis, 1949, p. 105.
- [29] BURRIS (R.M.), *In Umbreit et al : Manometric Technics and Tissue Metabolism.* Burgess Publ. édit. Minneapolis, 1949, p. 211.

- [30] CAMMARATA (P.S.), COHEN (P.P.), *Bioch. Bioph. Acta*, 1953, **10**, 117.
- [31] CAMPBELL (J.J.R.), STOKES (F.N.), *J. Biol. Chem.* 1951, **190**, 853.
- [32] CAMPBELL (J.J.R.), SMITH (R.A.), *Can. J. Microbiol.* 1956, **2**, 433.
- [33] CAVALLINI (D.), FRONTALLI (N.), *Bioch. Bioph. Acta*, 1954, **13**, 439.
- [34] CESAIRE (O.G.), NENZIL (E.), BOIRON (M.), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1958, **40**, 1435.
- [35] CHARLOT (G.) et GAUGUIN (R.), *Dosages colorimétriques*. Masson édit. Paris. 1952, p. 157.
- [36] CHEFTEL (R.J.), MUNIER (R.), MACHEBOEUF (M.), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1951, **33**, 840.
- [37] CIONGA (E.), JANOT (M.), *Bull. Sc. Pharmacol.* 1935, **42**, 349.
- [38] COHEN (P.P.), *Bioch. J.* 1939, **33**, 1478.
- [39] COHEN (P.P.), *J. Biol. Chem.* 1940, **136**, 565.
- [40] CONSDEN (R.), GORDON (A.M.), MARTIN (A.J.P.), *Bioch. J.* 1944, **38**, 224.
- [41] CONWAY (E.J.), *Microdiffusion Analysis and volumetric Error*. Grosby Lockwood édit. London. 1950, p. 95.
- [42] CRUMPLER (M.R.), DENT (C.E.), *Nature*, 1949, **164**, 441.
- [43] DAGLEY (S.), DAWES (E.A.), MORRISON (G.A.), *Nature*, 1950, **165**, 437.
- [44] DENT (C.E.), *Bioch. J.* 1948, **43**, 169.
- [45] DIXON (D.), *Biol. Rev.* 1929, **4**, 352.
- [46] DRAGGENDORF (G.), *Die gesichtlichen chemische Ermittlung von Giften*. Berlin. 1895, 111.
- [47] DURRUM (E.), *Bioch. J.* 1948, **43**, 169.
- [48] EDSON (N.L.), *Bioch. J.* 1935, **29**, 2082.
- [49] EFFRONT (J.), *Bull. Soc. Chim. France*, 1890, **4**, 337. Cité par AUBEL [10].
- [50] ELDBACHER, *Ztschr. physiol. Chem.* 1941, **270**, 165.
- [51] EPPS (H.R.M.), *Bioch. J.* 1944, **38**, 242.
- [52] ERRERA (M.), *J. Biol. Chem.* 1949, **178**, 483.
- [53] ERRERA (M.), GREENSTEIN (J.P.), *J. Biol. Chem.* 1949, **178**, 495.
- [54] EULER et Coll., *Ztschr. Physiol. Chem.* 1938, **255**, 14.
- [55] EVANS (M.J.), HALL (N.S.), *Science*, 1955, **122**, 922.
- [56] FEIGL (F.), *Spot Test*. Elsevier édit. Amsterdam, 1954. Tome II, p. 186.
- [57] FEIGL (F.), AUGER (V.), ZAPPERT (R.), *Mikrochemica Acta*, 1953, **16**, 71.
- [58] FEIGL (F.), LENZER (A.), *Mikrochemica Acta*, 1937, **1**, 123.
- [59] FELDMANN (L.J.), GUNSALUS (I.C.), *J. Biol. Chem.* 1950, **187**, 821.
- [60] FENTON (M.J.H.), JONES H.O.), *J. Chem. Soc.* 1900, **77**, 77.
- [61] FOWDEN (L.), *Bioch. J.* 1951, **48**, 327.
- [62] FOWDEN (L.), *Bioch. J.* 1952, **50**, 355.
- [63] FRIEDHEIM (A.), *C.R. Soc. Biol.* 1932, **110**, 353.
- [64] FRIEDMAN (L.), KOSOWER (E.), *Organic Synthesis*. 1946, **26**, 42.
- [65] FROMAGEOT (C.), JUTICZ (M.), TESSIER (P.), *Bull. Soc. Chem. Biol.* 1949, **31**, 689.

- [66] GALE (E.F.), *Bioch. J.* 1945, **39**, 46.
- [67] GALE (E.F.), *Nature*, 1946, **157**, 205.
- [68] GALE (E.F.), EPPS (H.R.M.), *Bioch. J.* 1944, **38**, 232.
- [69] GARIBALDI (J.A.), NEILANDS (J.B.), *Nature*, 1956, **177**, 526.
- [70] GEST (M.), *J. of Bact.* 1952, **63**, 111.
- [71] GIRI (K.V.) NAU-RAO. *Nature*. 1952, **169**, 923.
- [72] GOPPELSROEDER (F.), *Kolloid Z.* 1909, **4**, 23, 94, 191, 236 et 312. Cité par : BLOCK (R.J.), DURRUM (E.M.), ZWEIG (G.). *Paper Chromotography and Electrophoresis*. Acad. Press. Inc. édit. New York, 1958.
- [73] GRANDJEAN-RADOWITCH (C.M.), Thèse Pharmacie, Nancy. 1955, p. 61.
- [74] GRANDJEAN-RADOWITCH (C.M.), Thèse Pharmacie, Nancy. 1955, p. 155.
- [75] GRASSMANN (W.), MAYR (O.), *Ztschr. physiol. Chem.* 1933, **214**, 185.
- [76] GREEN (J.A.), RAPPOPORT (D.A.), WILLIAMS (R.P.), *J. of Bact.* 1956, **72**, 483.
- [77] GUILLAUME (J.), OSTEUX (R.), *C.R. Ac. Sc.* 1955, **241**, 501.
- [78] HAWARY (M.F.S.), THOMPSON (R.S.H.), *Bioch. J.* 1954, **58**, 518.
- [79] HENSTOCK (M.), *J. Chem. Soc.* 1933, **216**, 311.
- [80] HORN (F.), *Ztschr. Physiol. Chem.* 1933, **216**, 244.
- [81] HUBBARD (R.), RIMINGTON (C.), *Bioch. J.* 1950, **46**, 220.
- [82] HUGUES (D.E.), WILLIAMSON (D.H.), *Bioch. J.* 1952, **51**, 45.
- [83] HULME (A.C.), *Nature*, 1953, **171**, 610.
- [84] INGOLD (C.K.), *J. Chem. Soc.* 1921, **119**, 326.
- [85] JOHNSON (G.D.), *J. am. Chem. Soc.* 1951, **73**, 5888.
- [86] JUNI (E.), *J. Biol. Chem.* 1952, 195, 715.
- [87] JUNI (E.), HEYM (G.A.), *J. of Bact.* 1956, **71**, 4.
- [88] KAPLAN (O.), COLLOWICK (J.P.), NEUFELD (E.F.), *J. Biol. Chem.* 1952, **199**, 107.
- [89] KAWERAN (E.), WIELAND (Th.), *Nature*, 1951, **168**, 77.
- [90] KELLY (T.L.), SIGURA (M.), *J. am. Chem. Soc.* 1934, **56**, 2497.
- [91] KLAUSMEYER (R.), BARD (R.), *J. of Bact.* 1954, **68**, 129.
- [92] KLUYVER (A.J.), *Symposium micro. Metabolism*. Rome 1954, p. 771.
- [93] KLUYVER, DONKER et WISSERTHOF : cité par LEBERT (F.). *Techniques d'isolement et de détermination des anaérobies*. Pacomby édit. Paris, 1949.
- [94] KOLTHOFF (J.M.), LINGANE (J.J.), *Polarography*. 2 vol., Interscience, Pub. édit. New York, 1952.
- [95] KRASNA (A.I.), RITTENBERG (D.), *J. of Bact.* 1954, **68**, 53.
- [96] KREBS (M.A.), *Bioch. J.* 1938, **32**, 108.
- [97] KREBS (M.A.), EGGLESTON (L.V.), *Bioch. J.* 1940, **34**, 1836.
- [98] KREBS (M.A.), GURIN (S.), EGGLESTON (L.V.), *Bioch. J.* 1952, **51**, 614.

- [99] LASCELLES (J.), STILL (J.L.), *Aust. J. Expl. biol. Med.* 1946, **24**, 159.
- [100] LASSEUR (Ph.), Thèse Doctorat ès Sciences, Nancy. 1911.
- [101] LASSEUR (Ph.), *C.R. Soc. Biol.* 1911, **70**, 754. 1913, **74**, 496.
- [102] LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.), GAVOILLE (M.T.), BONNEFOY (C.), *Trav. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1942, **13**, 63.
- [103] LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.), MOULIN (A.), *Trav. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1936, **9**, 35. 1936, **10**, 11.
- [104] LASSEUR (Ph.), DUPAIX-LASSEUR (A.), PÉPIN (J.), *Trav. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1942, **13**, 153.
- [105] LASSEUR (Ph.), MARCHAL (J.G.), DUPAIX (A.), RENAUX (M.), *Trav. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1932, **5**, 111.
- [106] LASSEUR (Ph.), THIRY (G.), DUPAIX (A.), *Trav. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1930, **3**, 53.
- [107] LEIFSON (G.), *J. of Bact.* 1951, **62**, 377.
- [108] LELOIR (L.F.), *Advances in Enzymology*. Cité par : NEILANDS et STUMPF [151].
- [109] LEMOIGNE (M.), MONGUILLON (P.), DESVAUX (R.), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1936, **18**, 841.
- [110] LEMOIGNE (M.), DE SOMER (A.), CROSON (M.), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1953, **33**, 1423.
- [111] LICHSTEIN (H.C.), *Ann. Rev. of Microb.* 1952, **6**, 1.
- [112] LICHSTEIN (H.C.), COHEN (P.P.), *J. Biol. Chem.* 1945, **157**, 85.
- [113] LICHSTEIN (H.C.), GUNSALUS (I.C.), UMBREIT (W.W.), *J. Biol. Chem.* 1945, **161**, 311.
- [114] LIPMAN (F.), *Biochem. Z.* 1928, **196**, 2.
- [115] LISSITSKY (S.), CESAIRE (G.), MASSONET (R.), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1954, **36**, 655.
- [116] LOEFFLER (J.F.), REICHL (E.R.), *Mikroch. Acta Chem.* 1952, **24**, 1658.
- [117] LONG (A.G.), QUAYLE (J.R.), STEDMANN (R.J.), *J. Chem. Soc.* 1951, 2197.
- [118] LUGG (J.V.M.), OVERELL (B.T.), *Nature*, 1947, **160**, 87.
- [119] MACHEBOEUF (M.), *Bull. Ass. Dipl. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1956, **18**, 25.
- [120] MACHEBOEUF (M.), MUNIER (R.), ALLOUF (R.), *In Loiseleur, Techniques de Laboratoires*, Masson édit. Paris, 1954.
- [121] MACHEBOEUF (M.), REBEYROTTE (P.), DUBERT (J.M.), BRUNERIE (M.), *Microélectrophorèse sur papier*. Expansion Sci. édit. Paris, 1955.
- [122] Mc ILVAINE (J.C.), *J. Biol. Chem.* 1921, **49**, 183.
- [123] MARCHAL (J.G.), *Tr. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1937, **10**, 90.
- [124] MARCHAL (J.G.), *Tr. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1956, **18**, 15.
- [125] MARCHAL (J.G.), ADAMS (R.A.), *Tr. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1956, **18**, 33.
- [126] MARCHAL (J.G.), BENE (R.), *Tr. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1956, **18**, 25.
- [127] MARCHAL (J.G.), CLAIRET (P.), DUPAIX-LASSEUR (A.), *Tr. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1950, **17**, 55.
- [128] MARCHAL (J.G.), GRANDJEAN-RADOWITCH (C.M.), *Ann. Biol. clin.* 1957, **15**, 365.
- [129] MARCHAL (J.G.), KERGARAVAT (A.), PÉPIN (J.), *Trav. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1947, **15**, 51.

- [130] MARCHAL (J.G.), LOTZ (F.), *Trav. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1953, **17**, 31.
- [131] MARCHAL (J.G.), MITTWER (T.), *Trav. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy. 1950, **17**, 107.
- [132] MARCHAL (J.G.), MITTWER (T.), *C.R. Soc. Biol.* 1951, **145**, 417.
- [133] MARCHAL (J.G.), POUTEAU-THOUVENOT (M.), *Trav. Lab. Micr. Fac. Pharmacie*, Nancy, 1956, **18**, 92.
- [134] MARCHAL (J.G.), THOMAS (P.), *C.R. Soc. Biol.* 1944, **138**, 168.
- [135] MARTIUS (C.), NITZ-LITZOW (D.), *Chem. Ber.* 1952, **85**, 605.
- [136] MEISTER (A.), *In Collowick et Kaplan : Methods in Enzymology*. Ac. press. Inc. édit. New York 1955, vol. II, p. 413.
- [137] MEISTER (A.), FRASER (P.E.), *J. Biol. Chem.* 1954, **210**, 37.
- [138] MEITES (L.), *Polarographic Technics*. Intersciences Pub. édit. New York 1955., p. 247.
- [139] MEYERHOF (O.), LOHMANN (K.), *Bioch. Z.* 1934, **271**, 89. 1934, **274**, 413.
- [140] MICHAELIS (L.), *Biochem. Z.* 1931, **234**, 139.
- [141] MINGOIA (Q.), *Gazz. chim. Ital.* 1930, **60**, 134. Cité par : GRIGNARD, *Traité Chimie organique*. Masson édit. Paris, 1942, tome XIX, p. 70.
- [142] MONOD (J.), *C.R. Acad. Sc.* 1937, **205**, 1456. 1941, **212**, 771 et 934.
- [143] MONOD (J.), *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*. Hermann édit. Paris. 1942.
- [144] NAJJAR (V.A.), *In Collowick et Kaplan : Methods in Enzymology*. Ac. press. Inc. édit. New York, 1955, vol. II, p. 420.
- [145] NAJJAR (V.A.), ALLEN (M.B.), *J. Biol. Chem.* 1954, **206**, 209.
- [146] NAJJAR (V.A.), FISHER (J.), *J. Biol. Chem.* 1954, **206**, 215.
- [147] NASON (A.), ABRAHAM (R.G.), AVERBACH (B.C.), *Bioch. bioph. Acta*, 1954, **15**, 160.
- [148] NASON (A.), EVANS (M.J.), *In Collowick et Kaplan : Method in Enzymology*. Ac. press. Inc. édit. New York, 1955. Tome II, p. 413.
- [149] NASON (A.), TAKAHASHI (H.), *Ann. Rev. of Microb.* 1958, **12**, 208.
- [150] NEEDHAN (D.R.), *Bioch. J.* 1930, **24**, 308.
- [151] NEILANDS (J.B.), STUMPF (P.K.), *Outlines of enzyme Chemistry*, John Wilby Pub. édit. New York, 1958, p. 244.
- [152] NICHOLAS (D.J.D.), *Nature*, 1957, **179**, 800.
- [153] NICHOLAS (D.J.D.), NASON (A.), *J. Biol. Chem.* 1954, **207**, 353.
- [154] NICHOLAS (D.J.D.), NASON (A.), *J. Biol. Chem.* 1954, **211**, 183.
- [155] NISMAN (B.), THOUVENOT (M.), *Ann. Inst. Pasteur* 1948, **75**, 310.
- [156] NISMAN (B.), VINET (G.), *Ann. Inst. Pasteur* 1949, **77**, 277.
C.R. Ac. Sc. 1949, **229**, 675.
- [157] NISONOFF (A.), HENRY (S.S.), BARNES Jr. (F.W.), *J. Biol. Chem.* 1952, **199**, 699.
- [158] NORDMANN (R.), GAUCHERY (O.), DU RUISSEAU (J.P.), THOMAS (P.), NORDMAN (J.), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1954, **36**, 1461.
- [159] NORDMANN (J.), NORDMANN (R.), GAUCHERY (O.), *Rev. Fran. Et. Clin. et Biol.* 1956, **1**, 67.

- [160] OGINSKY (E.L.), GEHRIG (R.F.), *J. Biol. Chem.* 1952, **198**, 799.
- [161] OGINSKY (E.L.), GEHRIG (R.F.), *J. Biol. Chem.* 1952, **199**, 91.
- [162] PARTRIDGE (S.M.), *Bioch. J.* 1948, **42**, 238.
- [163] PHELPS (A.), *J. Expl. Zool.* 1935, **70**, 109. 1936, **72**, 474.
- [164] PHILIPPS (J.D.), POLLARD (A.), *Nature*, 1953, **171**, 41.
- [165] PICKETT (L.W.), HOFFLICH (N.J.), LIU (T.), *J. am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 4865.
- [166] PICHINOTY (F.), SENEZ (J.C.), *C.R. Acad. Sc.* 1958, **247**, 361.
- [167] QUASTEL (J.H.), WOOLF (B.), *Bioch. J.* 1926, **20**, 166.
- [168] QUASTEL (J.H.), WOOLF (B.), *Bioch. J.* 1926, **20**, 545.
- [169] QUASTEL (J.H.), WOODBRIDGE (W.R.), *Bioch. J.* 1928, **22**, 689.
- [170] RACKER (E.), *Bioch. Bioph. Acta*, 1950, **4**, 20.
- [171] RAYNAUD (M.), GROS (F.), *Ann. Inst. Pasteur* 1947, **73**, 1003.
- [172] ROBINSON (J.), KATZNELSON (M.), *Can. J. of Microb.* 1956, **2**, 723.
- [173] RUDMAN (D.), MEISTER (A.), *J. Biol. Chem.* 1953, **200**, 591.
- [174] SADANA (J.C.), JAGAMATHAN (V.), *Bioch. Bioph. Acta*, 1954, **14**, 297.
- [175] SAMUELSON (O.), *In Ion Exchanges in analytical Chemistry*. Almquist et Wiksell édité. Stockholm 1952.
- [176] SATO (R.), *Sc. Rev. (Holland)* 1950, **2**, 122. Cité par : NASON et TAKAHASHI [149].
- [177] SATO (R.), *In Inorganic Nitrogen Metabolism*. John Hopkins Press édité. Baltimore, 1956, p. 163.
- [178] SCHMIDT (G.C.), LOGAN (M.A.), TYTELL (A.A.), *J. Biol. Chem.* 1952, **198**, 771.
- [179] SENEZ (J.), *Ann. Inst. Pasteur* 1952, **83**, 786.
- [180] SENEZ (J.C.), PICHINOTY (F.), *Bioch. Bioph. Acta*, 1958, **27**, 569.
- [181] SHIBATA (K.), BENSON (A.A.), CALVIN (M.), *Bioch. Bioph. Acta*, 1954, **15**, 461.
- [182] SILVERMANN (M.), WERKMANN (C.M.), *J. Biol. Chem.* 1941, **138**, 35.
- [183] SLADE (M.D.), DOUGHTY (C.C.), SLAMP (W.C.), *Arch. Bioch. and Bioph.* 1954, **48**, 338.
- [184] SOLEIL (J.), HIRT (G.), *Bull. Soc. Pharmacie*, Nancy, 1958, **36**, 29.
- [185] STADTMAN (E.R.), STADTMAN (Th.), *Ann. Rev. of Microb.* 1953, **7**, 143.
- [186] STARK (J.B.), GOODBAN (A.E.), OWENS (M.S.), *Analytic. chem.* 1951, **23**, 413.
- [187] SWIM (H.E.), KRANPITZ (L.O.), *J. of Bact.* 1954, **67**, 426.
- [188] SZENT-GYORGYI (A.), *Z. Physiol. Chem.* 1937, **249**, 211.
- [189] TABONNE (J.), ROBERT (D.), TROESTLER (J.), *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1948, **30**, 547.
- [190] TABOR (M.), HAYASHI (O.), *J. Biol. Chem.* 1952, **194**, 171.
- [191] TARHAZY (N.E.), WHITE (N.G.), UMBREIT (W.W.), *Arch. Biochem.* 1950, **28**, 36.
- [192] TAUBER (M.), *Analyt. Chem.* **27**, 287.
- [193] TAYLOR (E.S.), GALE (E.F.), *Bioch. J.* 1945, **39**, 52.
- [194] TEILLON (J.), VELU (M.), *Rev. Path. gén. et Phys. clin.* 1958, **697**, 565.

- [195] TOBIE (W.C.), *Proc. Soc. Biol. and Med.* 1936, **24**, 620.
- [196] TULPULE (P.G.), PATWARDMAN (V.N.), *Nature*, 1951, **168**, 1043.
- [197] TULPULE (P.G.), PATWARDMAN (V.N.), *Nature*, 1952, **169**, 671.
- [198] UMBREIT (W.W.), BURRIS (R.M.), STAUFFER (J.F.), *Manometric Technics and Tissu Metabolism*. Burgess Publ. Cy édit. Minneapolis 1949.
- [199] VEIBEL (S.), *In Identification des substances organiques*. Masson édit. Paris, 1957, p. 66.
- [200] VERHOEVEN (W.), *Aerobic Spore forming nitrate reducing bacteria*. Vitgerig Waltmann édit. Delft, 1952, p. 59.
- [201] VERHOEVEN (W.), *In Inorganic Nitrogen Metabolism*. J. Hopkins Press édit. Baltimore, 1956, p. 61.
- [202] VERHOEVEN (W.), TAKEDA (Y.), *In Inorganic Nitrogen Metabolism*. J. Hopkins Press édit. Baltimore, 1956, p. 159.
- [203] VIRTANEN (A.I.), CZAKY (T.Z.), *Nature*, 1948, **161**, 814.
- [204] WAELDELE, Thèse Doctorat Pharmacie, Strasbourg. 1938.
- [205] WARING (W.S.), WERKMANN (C.H.), *Arch. Biochem.* 1943, **1**, 303.
- [206] WATTIEZ (F.), STIERNON (N.), *In éléments de Biologie végétale*. Masson édit. Paris, 1942, p. 541.
- [207] WESTERFELD (W.W.), *J. Biol. Chem.* 1945, **161**, 495.
- [208] WILLIAMS (R.P.), GREEN (J.A.), RAPPOPORT (D.A.), *J. of Bact.* 1956, **71**, 115.
- [209] WILLIAMS (R.P.), TAYLOR (W.W.), HAWKINS Jr (D.), ROTH (I.L.), *Nature*, 1958, **182**, 1028.
- [210] WOODS (D.D.), *Bioch. J.* 1938, **32**, 2000.
- [211] WUGGATZER (W.Z.), CHRISTIAN (J.E.), *Science*, 1953. **118**, 444.
- [212] YAGAMATA (S.) *Acta phytochimica*. 1939, **11**, 145.
- [213] ZUCKER (M.), NASON (A.), *J. Biol. Chem.* 1955, **213**, 463.
- [214] ZUMAN (P.), *Collection Czechoskov. Chem. Communs.* 1950, **15**, 1107. Cité par : BREDINA et ZUMAN [25].

TABLE DES MATIÈRES

AVANT-PROPOS	9
INTRODUCTION	13

MÉTHODES D'ÉTUDE

1. - Mesure de la croissance (méthode biophotométrique)	17
2. - Méthodes chimiques	18
3. - Mesure de la respiration	22
4. - Chromatographie	22
A. - Généralités	22
B. - Application à l'identification des amino-acides	24
C. - Application à l'identification des acides organiques	26
5. - Electrophorese	30
6. - Polarographie	30

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Caractères de culture de <i>Ps. cattleyaecolor</i>	33
--	----

PARTIE I

MÉTABOLISME DE L'AZOTE PAR *PS. CATTLEYAECOLOR*

A. - *Azote minéral.*

I. - Milieux et sources d'azote utilisés	35
II. - Croissance de <i>Ps. cattleyaecolor</i> en présence de ces sources	
1. - En aérobiose	36
2. - En anaérobiose	37

III. - Etude du métabolisme de NO_3^- par <i>Ps. cattleyaecolor</i>	
1. - Avec les bactéries non proliférantes	40
2. - Avec la nitrate-réductase du germe	41
a) Obtention	42
b) Propriétés	44
c) Influence d'inhibiteurs	45
IV. - Métabolisme du nitrite formé	
1. - Sort du nitrate	48
2. - Evolution du nitrite	50
V. - Métabolisme de l'hydroxylamine	51
VI. - Evolution des donateurs d'hydrogène en présence du NO_2^- ou NO_3^-	
1. - Recherche des produits formés	52
2. - Action d'inhibiteurs de déshydrogénation	54
VII. - Conclusions	54

B. - *Passage de l'azote minéral sous forme organique.*

I. - Etude expérimentale	55
II. - Synthèse de certaines sources de carbone	56
III. - Amino-acides retrouvés	57

C. - *Azote organique.*

I. - Utilisation des amino-acides	61
1. - Mesure de la croissance	61
2. - Etude de la désamination	64
3. - Etude de la décarboxylation	72
4. - Etude de la transamination	74
II. - Autres sources d'azote organique	
1. - Asparagine	77
2. - Urée	78

PARTIE II

ASPECTS DU MÉTABOLISME CARBONE DE *PS. CATTLEYACOLOR*

I. - Croissance en présence de divers acides organiques	80
II. - Respiration en présence de divers acides organiques	83
1. - Conditions normales	84
2. - En présence d'inhibiteurs	88

III. - Recherche des déshydrogénases de <i>Ps. cattleyaecolor</i>	92
IV. - Acides organiques élaborés par <i>Ps. cattleyaecolor</i>	
1. - Recherche de ces acides	92
2. - Dosage des céto-acides	93
V. - Conclusions	95

PARTIE III

LA CHROMOGÉNÈSE DE <i>PS. CATTLYEAEOLOR</i>	98
I. - Facteurs conditionnant la production de pigment	
1. - Physiques	99
2. - Chimiques	
A. - Le fer	100
B. - Sources de carbone	101
C. - Sources d'azote	102
3. - Action des antibiotiques	103
4. - Existence occasionnelle d'un second pigment chez <i>Ps. cattleyaecolor</i> . .	104
II. - Le pigment de <i>Pseudomonas cattleyaecolor</i>	104
1. - Généralités sur les pigments microbiens	104
2. - Extraction du pigment	105
3. - Purification	106
4. - Propriétés physiques	108
5. - Nature chimique	
a) Présence de fer et dosage de celui-ci	109
b) Etude chimique de la partie organique du pigment	
§ Méthodes chimiques { 1. - Analyse élémentaire	114
2. - Caractéristiques du noyau pyrrole	114
3. - Recherche de groupements fonctionnels	117
§ Méthodes physiques { 1. - Polarographie	118
2. - Spectrophotométrie	119
c) Discussion et conclusions	120
6. - Propriétés et rôle	
a) Oxydoréductibilité	121
b) Agent de chélation	123
c) Rôle dans la vie de la bactérie	127
RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	131
BIBLIOGRAPHIE	135
TABLE DES MATIÈRES	143

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

“ LES CYTOCHROMES BACTÉRIENS ”

VU ET APPROUVÉ

Nancy, le 2 octobre 1959

Le Doyen de la Faculté des Sciences de Nancy,

E. URION

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 3 octobre 1959

*Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université,*

G. MAYER

